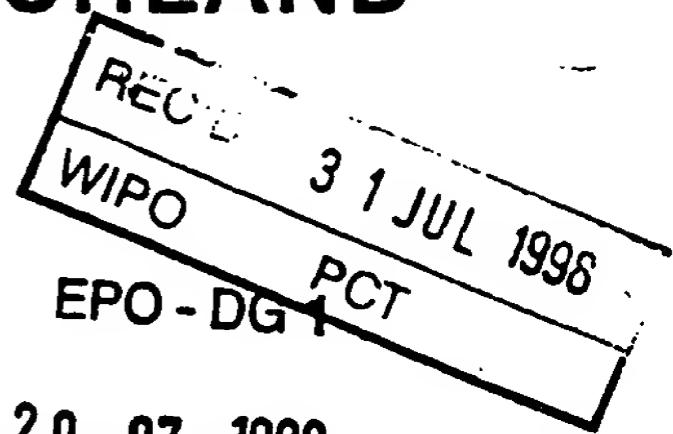




**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



20. 07. 1998

Bescheinigung

Die Bayer Aktiengesellschaft in Leverkusen/Deutschland hat
eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Humane katalytische Telomerase-Untereinheit und
deren diagnostische und therapeutische Verwen-
dung"

am 14. April 1998 beim Deutschen Patentamt eingereicht und
erklärt, daß sie dafür die Inneren Prioritäten der Anmel-
dungen in der Bundesrepublik Deutschland vom 20. Juni 1997,
Aktenzeichen 197 26 329.1, und vom 26. März 1998, Aktenzei-
chen 198 13 274.3, in Anspruch nimmt.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wieder-
gabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Sym-
bole C 12 N, C 07 H und C 07 K der Internationalen Patentclas-
sifikation erhalten.

München, den 29. Juni 1998

Der Präsident des Deutschen Patentamts

Im Auftrag

Joost

Aktenzeichen: 198 16 496.3

Humane katalytische Telomerase-Untereinheit und deren diagnostische und therapeutische Verwendung

Aufbau und Funktion der Chromosomenenden

5

Das genetische Material eukaryontischer Zellen ist auf linearen Chromosomen verteilt. Die Enden der Erbanlagen werden, abgeleitet von den griechischen Wörtern *telos* (Ende) und *meros* (Teil, Segment), als Telomere bezeichnet. Die meisten Telomere bestehen aus Wiederholungen von kurzen Sequenzen, die überwiegend aus Thymin und Guanin aufgebaut sind (Zakian, 1995). Die Telomersequenzen verwandter Organismen sind oft ähnlich und sogar zwischen phylogenetisch weiter entfernten Spezies konserviert. Bemerkenswert ist, daß in allen bislang untersuchten Wirbeltieren die Telomere aus der Sequenz TTAGGG aufgebaut werden (Meyne *et al.*, 1989).

10

15

Die Telomere üben verschiedene wichtige Funktionen aus. Sie verhindern die Fusion von Chromosomen (McClintock, 1941) und damit die Entstehung von dizentrischen Erbanlagen. Solche Chromosomen mit zwei Centromeren können durch Verlust der Heterozygotie bzw. Verdopplung oder Verlust von Genen zur Entwicklung von

20

Des Weiteren dienen Telomere dazu, intakte Erbanlagen von beschädigten zu unterscheiden. So stellten Hefezellen ihre Zellteilung ein, wenn sie ein Chromosom ohne Telomer enthielten (Sandell und Zakian, 1993).

25

Eine weitere wichtige Aufgabe erfüllen Telomere bei der DNA-Replikation eukaryontischer Zellen. Im Gegensatz zu den zirkulären Genomen von Prokaryonten können die linearen Chromosomen der Eukaryonten von dem DNA Polymerase-Komplex nicht vollständig repliziert werden. Zur Initiation der DNA-Replikation sind RNA-Primer notwendig. Nach Abspaltung der RNA-Primer, Verlängerung der Okazaki-Fragmente und anschließender Ligation fehlt dem neu-synthetisierten DNA-

30

Strang das 5'-Ende, denn dort kann der RNA-Primer nicht durch DNA ersetzt werden. Ohne besondere Schutzmechanismen würden daher die Chromosomen mit jeder Zellteilung schrumpfen ("end-replication problem"; Harley *et al.*, 1990). Die nicht-kodierenden Telomersequenzen stellen vermutlich eine Pufferzone dar, um dem Verlust von Genen vorzubeugen (Sandell und Zakian, 1993).

5

10

15

20

25

30

Darüberhinaus spielen Telomere auch eine wichtige Rolle bei der Regulation der zellulären Alterung (Olovnikov, 1973). Humane somatische Zellen zeigen in Kultur eine limitierte Replikationskapazität; sie werden nach einer gewissen Zeit seneszent. In diesem Zustand teilen sich die Zellen selbst nach Stimulierung mit Wachstumsfaktoren nicht mehr, sterben aber nicht, sondern bleiben metabolisch aktiv (Goldstein, 1990). Verschiedene Beobachtungen sprechen für die Hypothese, daß eine Zelle anhand der Länge ihrer Telomere bestimmt, wie oft sie sich noch teilen kann (Allsopp *et al.*, 1992).

Zusammenfassend besitzen die Telomere somit zentrale Funktionen bei der Alterung von Zellen sowie der Stabilisierung des genetischen Materials und Verhinderung von Krebs.

Das Enzym Telomerase synthetisiert die Telomere

Wie oben beschrieben können Organismen mit linearen Chromosomen ohne einen speziellen Schutzmechanismus ihr Genom nur unvollständig replizieren. Die meisten Eukaryonten verwenden zur Regeneration der Telomersequenzen ein spezielles Enzym, die Telomerase. In den bislang untersuchten Einzellern wird Telomerase konstitutiv exprimiert. Dagegen wurde in Menschen die Telomerase-Aktivität nur in Keimzellen und Tumorzellen gemessen, wogegen benachbartes somatisches Gewebe keine Telomerase enthielt (Kim *et al.*, 1994).

Telomerase in Ciliaten

Die Telomerase wurde, wie auch die Telomere, zuerst im Ciliaten *Tetrahymena thermophila* identifiziert. Die Telomerase-Aktivität wurde durch Verlängerung des einzelsträngigen Oligonukleotides d(TTGGGG)₄ in Gegenwart von dTTP und dGTP nachgewiesen (Greider und Blackburn, 1985). Dabei wurde an den Primer wiederholt 5 die *Tetrahymena*-Telomersequenz TTGGGG angehängt. Selbst wenn als Ausgangsmaterial ein Oligonukleotid mit der unregelmäßigen Telomersequenz von *Saccharomyces cerevisiae*, T(G)₁₋₃, angeboten wurde, verlängerte die Telomerase den Primer mit der Telomersequenz von *Tetrahymena* (Greider und Blackburn, 1985). Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, daß die Telomerase selbst die Vorlage für die 10 Sequenz der Telomere mit sich führt.

Nachdem zunächst die Existenz einer RNA-Komponente in der Telomerase nachgewiesen werden konnte (Greider und Blackburn, 1987), wurde kurze Zeit später das Gen für die RNA-Untereinheit der Telomerase kloniert (Greider und Blackburn, 15 1989). Diese RNA enthält eine Region mit dem Komplement zur Telomersequenz von *Tetrahymena* (nachfolgend "Komplement-Region" genannt). Die Telomerase-Aktivität war abhängig von der RNA-Komponente, was durch Verdau der RNA mit nachfolgendem Verlust der Aktivität gezeigt werden konnte. Wurde die Telomerase-RNA in ihrer Komplement-Region mutiert, so wurden die entsprechenden 20 Mutationen *in vivo* in die Telomere von *Tetrahymena* eingebaut (Yu *et al.*, 1990). Die Telomerase gehört demnach zur Klasse der RNA-abhängigen DNA-Polymerasen.

Die ersten Protein-Untereinheiten der *Tetrahymena*-Telomerase, p80 und p95, wurden 25 1995 identifiziert (Collins *et al.*, 1995). Die Beobachtung, daß p95 das Enzym an der DNA verankert und p80 die RNA-Komponente bindet, führte zu folgendem Modell: Die Telomerase-RNA lagert sich mit ihrer Komplement-Region an den einzelsträngigen 3'-Überhang an. Die Verlängerung des 3'-Überhangs geschieht durch Einbau der entsprechenden Nukleotide in 5'-3'-Richtung. Die *de novo*-Synthese von 30 Telomeren beinhaltet wahrscheinlich einen Elongations- und einen Translokations-schritt. Ist eine Telomersequenz synthetisiert worden, bewegt sich die Telomerase

vermutlich an der DNA entlang, bis sie wieder in einer Position ist, um eine vollständige Telomersequenz hinzuzufügen. Dieses Modell muß nicht allgemeingültig sein, denn zwischen Telomerasen unterschiedlicher Spezies bestehen große Unterschiede in der Anzahl der Nukleotide, die das Enzym addiert bevor es vom Telomer 5 dissoziiert (Prowse *et al.*, 1993).

Darüberhinaus wurden kürzlich auch Telomerase-Untereinheiten anderer Organismen identifiziert. In dem Ciliaten *Euplotes aediculatus* wurden zwei Protein-Untereinheiten, p123 und p43, gefunden, welche keine Homologie zu den 10 *Tetrahymena*-Telomerase-Proteinen zeigen. Die Telomerase-Untereinheit p123 weist an ihrem N-Terminus eine basische Domäne und am C-Terminus eine Domäne für eine Reverse Transkriptase (RT) auf, was auf eine katalytische Funktion dieses Proteins hindeutet (Lingner *et al.*, 1997). Darüberhinaus wurde eine signifikante 15 Homologie von p123 zu dem von Lundblad gefundenen Protein Est2 aus *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben (Lingner *et al.*, 1997).

Während für p80 und p95 bisher keine essentielle Funktion für die Telomeraseaktivität nachgewiesen wurde, konnte für die potentiellen katalytischen Untereinheiten der Telomerase p123/est2p eindeutig eine Schlüsselfunktion aufgezeigt werden: Eine 20 Mutation des RT-Aktivitätzentrums von est2p führte zu einer signifikanten Verkürzung der Telomere in Hefezellen (Lingner *et al.*, 1997).

Telomerase-Komponenten aus Säugerzellen

Inzwischen wurden die RNA-Komponenten der Telomerasen von verschiedenen Organismen, unter anderem von *Saccharomyces cerevisiae*, Mäusen und Menschen 25 (Singer und Gottschling, 1994; Blasco *et al.*, 1996; Feng *et al.*, 1995), kloniert. Alle bislang bekannten Telomerase-RNAs enthalten eine Region, die komplementär zu der Telomersequenz des jeweiligen Organismus ist. Die Primärsequenz der humanen 30 Telomerase-RNA (hTR) weist jedoch keine Ähnlichkeiten mit den RNA-Komponenten der Ciliaten oder *Saccharomyces cerevisiae* auf. Dagegen existieren konservierte

Bereiche zwischen der humanen und der murinen Telomerase-RNA (Feng *et al.*, 1995).

Vor kurzem wurde die Isolation eines humanen Telomerase-assoziertes Proteins (hTP1) beschrieben (Harrington *et al.*, 1997). Das korrespondierende Gen wurde aufgrund seiner Homologie zu der *Tetrahymena* Telomerase Untereinheit p80 in einer nicht der Allgemeinheit zugänglichen EST Datenbank gefunden (Harrington *et al.*, 1997). hTP1 ist aus 2627 Aminosäuren zusammengesetzt und zeigt im N-Terminus drei Domänen, welche maximal zu 46% homolog zu p80 sind. Als weiteres Struktur-element konnten im C-terminalen Bereich 16 Wiederholungen aus den Aminosäuren Tryptophan und Asparagin aufgezeigt werden, die vermutlich eine Protein-Protein Interaktion vermitteln.

Aktivierung der Telomerase in menschlichen Tumoren

Eine Aktivität der Telomerase konnte in Menschen ursprünglich nur in Keimbahnzellen, nicht aber in normalen somatischen Zellen (Hastie *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 1994) nachgewiesen werden. Nach der Entwicklung eines sensitiveren Nachweisverfahrens (Kim *et al.*, 1994) wurde auch in hematopoietischen Zellen eine geringe Telomerase-aktivität detektiert (Broccoli *et al.*, 1995; Counter *et al.*, 1995; Hiyama *et al.*, 1995). Allerdings wiesen diese Zellen trotzdem eine Reduktion der Telomere auf (Vaziri *et al.*, 1994; Counter *et al.*, 1995). Noch ist nicht geklärt, ob die Menge an Enzym in diesen Zellen nicht ausreichend für eine Kompensation des Telomerverlustes ist, oder ob die gemessene Telomerase-Aktivität von einer Subpopulation, z.B. unvollständig ausdifferenzierten CD34⁺38⁺-Vorläuferzellen, herrührt (Hiyama *et al.*, 1995). Zur Klärung wäre ein Nachweis der Telomerase-Aktivität in einer einzelnen Zelle nötig.

Interessanterweise wurde jedoch in einer großen Zahl der bislang getesteten Tumorgeweben eine signifikante Telomerase-Aktivität nachgewiesen (1734/2031, 85%; Shay, 1997), während in normalem somatischen Gewebe keine Aktivität gefunden wurde (1/196, <1%, Shay, 1997). Verschiedene Untersuchungen zeigten außerdem,

daß in seneszenten Zellen, die mit viralen Oncoproteinen transformiert wurden, die Telomere weiterhin schrumpften und Telomerase nur in der Subpopulation entdeckt werden konnte, die die Wachstumskrise überlebte (Counter *et al.*, 1992). In diesen immortalisierten Zellen waren auch die Telomere stabil (Counter *et al.*, 1992). Ähnliche Befunde aus Untersuchungen an Mäusen (Blasco *et al.*, 1996) stützen die Annahme, daß eine Reaktivierung der Telomerase ein spätes Ereignis in der Tumorgenese ist.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde eine "Telomerase-Hypothese" entwickelt, die den Verlust von Telomersequenzen und Zellalterung mit der Aktivität von Telomerase und der Entstehung von Krebs verbindet. In langlebigen Spezies wie dem Menschen kann das Schrumpfen der Telomere als ein Mechanismus zur Tumorsuppression angesehen werden. Ausdifferenzierte Zellen, die keine Telomerase enthalten, stellen bei einer bestimmten Länge der Telomere ihre Zellteilung ein. Mutiert eine solche Zelle, so kann aus ihr nur dann ein Tumor entstehen, wenn die Zelle ihre Telomere verlängern kann. Ansonsten würde die Zelle weiterhin Telomersequenzen verlieren, bis ihre Chromosomen instabil werden und sie schließlich zugrunde geht. Die Reaktivierung der Telomerase ist vermutlich der Hauptmechanismus von Tumorzellen zur Stabilisation ihrer Telomere.

Aus diesen Beobachtungen und Überlegungen ergibt sich, daß eine Inhibition der Telomerase eine Therapie von Tumoren erlauben sollte. Konventionelle Krebstherapien mit Zytostatika oder kurzweligen Strahlen schädigen nicht nur die Tumorzellen, sondern alle sich teilenden Zellen des Körpers. Da aber außer Tumorzellen nur Keimbahnzellen eine signifikante Telomerase-Aktivität enthalten, würden Telomerase-Inhibitoren spezifischer die Tumorzellen angreifen und somit weniger unerwünschte Nebenwirkungen hervorrufen. In allen bislang getesteten Tumorgeweben wurde eine Telomerase-Aktivität nachgewiesen, so daß diese Therapeutika gegen alle Krebsarten eingesetzt werden könnten. Die Wirkung von Telomerase-Inhibitoren würde dann eintreten, wenn die Telomere der Zellen sich soweit verkürzt haben, daß das Genom instabil wird. Da Tumorzellen meist kürzere

Telomere aufweisen als normale somatische Zellen, würden zuerst Krebszellen durch Telomerase-Inhibitoren eliminiert werden. Zellen mit langen Telomeren, wie die Keimzellen, würden dagegen erst viel später geschädigt werden. Telomerase-Inhibitoren stellen somit einen zukunftsweisenden Weg für die Therapierung von Krebs dar.

Eindeutige Antworten auf die Frage nach der Art und den Angriffspunkten physiologischer Telomerase-Inhibitoren werden aber erst möglich sein, wenn auch die Proteinstrukturen des Enzyms mit ihren Funktionen identifiziert und die Erkenntnisse über verschiedene Telomer-bindende Proteine vertieft sind.

Die Erfindung betrifft die katalytisch aktive humane Telomerase-Untereinheit (phTC) gegebenenfalls in aufgereinigter Form, aktive Teile des Proteins, Modulatoren, insbesondere Agonisten des Proteins, die Funktion des Proteins imitierende Substanzen sowie Kombinationen aus diesen Komponenten.

Die Erfindung betrifft weiterhin:

- Die Sequenz, die für das humane Protein phTC kodiert, im einzelnen:
 - die genomische Sequenz des hTC-Gens,
 - die cDNA-Sequenz des hTC-Gens ,
 - die DNA-Sequenz von hTC-Varianten
 - die Sequenz der mRNA, die vom hTC Gen transkribiert wird,
 - Teile aus den oben genannten Sequenzen, darunter die in der Abbildung 1 gezeigte DNA Sequenz von hTC.
- Die Sequenzen, die in anderen Säugern für dem hTC homologe Proteine kodieren, im einzelnen:
 - die genomischen Sequenzen hTC-homologer Gene,

- die cDNA-Sequenzen hTC-homologer Gene,
- die Sequenzen der mRNAs, die von hTC-homologen Genen transkribiert werden,
- Teile aus den oben genannten Sequenzen.

5

- Sequenzen, die für das Protein phTC verwandte Proteine im Menschen und anderen Säugern kodieren, im einzelnen:

10

- die genomischen Sequenzen hTC-verwandter Gene in Mensch und anderen Säugern,
- die cDNA-Sequenzen hTC-verwandter Gene in Mensch und anderen Säugern,
- die Sequenzen der mRNAs, die von hTC-verwandten Genen transkribiert werden in Mensch und anderen Säugern,
- Teile aus den oben genannten Sequenzen.

15

- Das oben beschriebene phTC Protein, isoliert aus Säugerzellen.

20

- Das phTC Protein, markiert mit einem Nachweis-Reagenz, wobei das Nachweis-Reagenz bevorzugt ein Enzym, ein radioaktiv markiertes Element oder eine fluoreszierende Chemikalie ist.

25

- Einen Antikörper, der gegen das phTC Protein gerichtet ist.

- Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist dies ein polyklonaler Antikörper.

- Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist dies ein monoklonaler Antikörper.

30

Solche Antikörper können beispielsweise produziert werden durch die Injektion eines substantiell immunkompetenten Wirts mit einer für die Antikörperproduktion effektiven Menge eines phTC Polypeptids oder eines Fragments davon und durch nachfolgende Gewinnung dieses Antikörpers.

5

Weiterhin lässt sich in an sich bekannter Weise eine immortalisierte Zelllinie erhalten, die monoklonale Antikörper produziert.

10

Die Antikörper können gegebenenfalls mit einem Nachweisreagenz markiert sein.

Anstelle des vollständigen Antikörpers können auch Fragmente eingesetzt werden, die die gewünschten spezifischen Bindungseigenschaften besitzen.

15

Bevorzugte Beispiele für ein solches Nachweis-Reagenz sind Enzyme, radioaktiv markierte Elemente, fluoreszierende Chemikalien oder Biotin.

20

Oligonukleotide in aufgereinigter Form mit einer Sequenz, die identisch oder exakt komplementär ist zu einer 10 bis 500 Nukleotide langen, zusammenhängenden Sequenz der oben beschriebenen genomischen DNA, cDNA oder mRNA.

25

Ein solches Oligonukleotid kann insbesondere ein Oligodesoxyribonucleotid oder ein Oligoribonucleotid oder eine Peptidnukleotidsäure (PNA) sein

30

Bevorzugt sind Oligonukleotide, welche die Aktivität der Telomerase inhibieren, reprimieren oder blockieren, wenn sie an die hTC mRNA binden.

Eine DNA Sequenz oder eine degenerierte Variation dieser Sequenz, die das Protein phTC oder ein Fragment dieses Proteins kodiert, gegebenenfalls enthaltend die DNA Sequenz aus Abbildung 1, oder DNA Sequenz, die mit der

vorgehend aufgeführten DNA Sequenz unter Standard-Hybridisierungsbedingungen hybridisiert.

5

Ein rekombinantes DNA Molekül, das eine DNA Sequenz oder eine degenerierte Variation dieser Sequenz beinhaltet, die phTC oder ein Fragment von phTC kodiert, wobei letztere Sequenz bevorzugt die DNA Sequenz aus Abbildung 1 enthält, oder das eine solche DNA Sequenz beinhaltet, die mit der vorgehend aufgeführten DNA Sequenz unter Standard-Hybridisierungsbedingungen hybridisiert.

10

Bevorzugt ist in dem oben genannten rekombinanten DNA Molekül die beschriebene DNA mit einer Expressions-Kontrollsequenz verbunden.

15

Besonders bevorzugt als Expressions-Kontrollsequenz sind z.B. der frühe oder späte Promotor des SV40- oder Adenovirus, das lac System, das trp System, das TAC System, das TRC System, die Haupt-Operator- und Promotorregionen des Phagen λ , die Kontrollregionen des fd Hüllproteins, der Promotor der 3-Phosphoglycerat Kinase, der Promotor der Sauren Phosphatase und der Promotor des α -Mating Faktors der Hefe.

20

Einen einzelligen Wirt, der mit einem oben beschriebenen rekombinanten DNA Molekül transformiert wurde, das die DNA Sequenz oder eine degenerierte Variante dieser Sequenz enthält, die für das phTC Protein oder einen Teil dieses Protein kodiert. In diesem rekombinanten DNA-Molekül ist die besagte DNA Sequenz mit einer Expressions-Kontrollsequenz verknüpft.

25

Bevorzugte Beispiele für den einzelligen Wirt sind: *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, yeasts, CHO, R1.1, B-W, L-M, COS 1, COS 7, BSC1, BSC40 und BMT10. Zellen, Pflanzenzellen, Insektenzellen und Säuerzellen in Zellkultur.

30

- Einen rekombinanten Virus, der mit einem der vorstehend beschriebenen DNA Moleküle oder einem Derivat oder Fragment dieses Moleküls transformiert wird.

5 - Eine Methode zur Inhibition der Telomeraseaktivität in humanen Zellen, bevorzugt neoplastische Zellen, bei der ein exogenes Polynukleotid in die Zellen transferiert wird, das aus einer Transkriptionseinheit besteht. Diese Transkriptionseinheit beinhaltet eine Polynukleotidsequenz aus mindestens 29 aufeinanderfolgenden Nukleotiden, die substantiell identisch oder substantiell komplementär zur hTC RNA Sequenz ist und die mit einer heterologen Transkriptions-regulatorischen Sequenz verknüpft ist, die die Transkription des verknüpften Polynukleotids in besagten Zellen steuert.

10

15 Bevorzugt enthält die oben genannte heterologe Transkriptions-regulatorische Sequenz einen Promotor, der in humanen Zellen konstitutiv aktiv ist.

20 Alternativ kann die heterologe Transkriptions-regulatorische Sequenz einen Promotor enthalten, der in humanen Zellen durch Zugabe einer regulatorischen Substanz induziert oder reprimiert werden kann. Dazu zählen beispielsweise induzierbare und reprimierbare Tetrazyklin-abhängige Promotoren, Heatshock-Promotoren, Metallionen-abhängige Promotoren.

25 Das obengenannte exogene Polynukleotid kann beispielsweise ein virales Genom mit einer Transkriptionseinheit aus der humanen hTC DNA-Komponente sein.

30 Besonders bevorzugt produziert die besagte Transkriptionseinheit antisense RNA, die substantiell komplementär zur humanen hTC RNA-Komponente ist.

Weiterhin besonders bevorzugt kann das exogene Polynukleotid die Sequenz aus Abb. 1 enthalten.

5

Ein Polynukleotid für die Gentherapie einer menschlichen Krankheit. Dieses Polynukleotid besteht aus einer Transkriptionseinheit, die eine Polynukleotidsequenz aus mindestens 9 aufeinanderfolgenden Nukleotiden enthält, die substantiell identisch oder substantiell komplementär zur hTC RNA Sequenz ist und die mit einer heterologen Transkriptions-regulatorischen Sequenz verknüpft ist, die die Transkription des verknüpften Polynukleotids in besagten Zellen steuert.

10

Eine Methode zur Detektion Telomerase-assoziierter Zustände in einem Patienten, die folgende Schritte umfaßt:

15

- A. Detektion des phTC Proteins in Körperflüssigkeiten oder zellulären Proben, um einen diagnostischen Wert zu erhalten;
- B. Vergleich des diagnostischen Werts mit Standardwerten für das phTC Protein in standardisierten normalen Zellen oder Körperflüssigkeiten des gleichen Typs wie die Testprobe;
- C. Detektion diagnostischer Werte, die höher oder niedriger als Standardvergleichswerte liegen, indizieren einen Telomerase-assozierten Zustand, der wiederum einen pathogenen Zustand indiziert.

20

25

Bevorzugt wird diese Methode eingesetzt zur Detektion einer neoplastischen Erkrankung eines Patienten. Die Methode umfaßt dann folgende Schritte:

30

- A. Detektion des phTC Proteins in zellulären Proben, um einen diagnostischen Wert zu erhalten;
- B. Vergleich des diagnostischen Werts mit Standardwerten für das phTC Protein in nicht-neoplastischen Zellen des gleichen Typs wie die Testprobe;

C. Diagnostische Werte, die deutlich höher als Standardvergleichswerte liegen, indizieren einen neoplastischen Zustand.

5 - Eine Methode zur Bestimmung der Gegenwart des phTC Proteins in einer Zelle oder zellulären Probe, die auf der Amplifikation eines hTC-Polynukleotids oder Hybridisierung eines hTC-Polynukleotids, Primers oder einer hTC komplementären Sequenz mit einem hTC Polynukleotid beruhen.

10 - Ein Testkit zum Nachweis von phTC in zellulären Proben und Körperflüssigkeiten, wobei markierte, immunchemisch-reaktive Komponenten beispielsweise sein können: polyklonale Antikörper gegen phTC, monoklonale Antikörper gegen phTC, Fragmente dieser Antikörper oder einem Gemisch aus diesen Komponenten.

15 - Eine Methode zur Verhinderung und/oder Behandlung zellulärer (Zer-) Störung und/oder Fehlfunktion und/oder anderer Krankheitsbilder im Menschen, die auf der Gabe einer therapeutisch effektiven Menge an katalytisch aktiver humaner Telomerase, ihrer funktionellen Äquivalente oder ihrer katalytisch aktiven Fragmente beruht. Ebenfalls denkbar ist der Einsatz einer Substanz, die die Produktion und/oder Aktivität von phTC fördert; eine Substanz, die die Aktivität von phTC imitieren kann; einer Substanz, die die Produktion und/oder Aktivität von phTC inhibieren kann oder eines Gemisches dieser Substanzen. Weiterhin kann ein spezifischer Bindungspartner eingesetzt werden.

20

25 - Bevorzugt wird die Methode eingesetzt zur Verhinderung oder Behandlung der Alterung oder von Krebserkrankungen.

30 - Eine antisense-Nukleinsäure gegen die hTC mRNA, die eine Nukleotidsequenz enthält, die mit besagter mRNA hybridisiert, wobei die antisense-Nukleinsäure eine RNA oder eine DNA ist.

Bevorzugt bindet die antisense-Nukleinsäure an das Start-Kodon der jeweili-
gen mRNAs.

5 Ein rekombinantes DNA Molekül mit einer DNA Sequenz, von der bei der
Transkription eine antisense-Ribonukleinsäure gegen die hTC mRNA produ-
ziert wird. Diese besagte antisense-Ribonukleinsäure enthält eine Nukleinsäu-
resequenz, die mit der besagten hTC mRNA hybridisieren kann.

10 Ein solches DNA-Molekül kann zur Herstellung einer Zelllinie mit reduzierter
Expression von phTC eingesetzt werden, indem man eine phTC-
produzierende Zelllinie mit diesem rekombinanten DNA Molekül transfiziert.

Ein Ribozym, das die hTC mRNA spaltet.

15 Bevorzugt ist dies ein *Tetrahymena*-Typ Ribozym oder ein Hammerhead-Typ
Ribozym.

20 Ein rekombinantes DNA Molekül mit einer DNA Sequenz, deren Transkri-
ption zur Produktion eines solchen Ribozyms führt.

Dieses rekombinante DNA-Molekül kann eingesetzt werden um eine phTC-
produzierende Zelllinie zu transfizieren.

25 Eine Zusammenstellung, bestehend aus einem Paar von humanen hTC
Polynukleotid-PCR Primern, wobei die Primer bevorzugt aus Sequenzen
bestehen, die mit der Sequenz der humanen hTC mRNA korrespondieren oder
zu dieser Sequenz komplementär sind.

30 Eine Zusammenstellung, die eine Polynukleotid-Hybridisierungssonde für das
humane hTC Gen enthält, wobei die Sonde bevorzugt mindestens 29

aufeinanderfolgende Nukleotide enthält, die mit der Sequenz des humanen hTC Gens korrespondieren oder zu dieser komplementär sind.

5 Tiermodelle, mit denen die Telomerase/Telomer-Regulation *in vivo* untersucht werden kann. So können z.B. mit Knockout- oder transgenen Tieren Tumorentstehung und Alterung direkt untersucht werden.

10 Funktionelle Äquivalente sind im Fall von Proteinen oder Peptiden solche Verbindungen, die sich zwar hinsichtlich der Aminosäuresequenz unterscheiden können, aber im wesentlichen dieselben Funktionen haben.

Bekannte Beispiele hierfür sind Isoenzyme bzw. sogenannte Mikroheterogenitäten bei Proteinen.

15 Im Fall der Oligo- oder Polynucleinsäuren sollten unter funktionellen Äquivalenten solche Verbindungen verstanden werden, die sich in der Nucleotid-Sequenz unterscheiden, aber für das selbe Protein codieren. Dies ist z.B. auf den degenerierten genetischen Code zurückzuführen.

20 Erläuterung der Abbildungen:

Fig. 1 cDNA Sequenz der humanen katalytischen Telomerase-Untereinheit (hTC).

25 Fig. 2: Abgeleitete Aminosäuresequenz von der in Fig.1 dargestellten hTC DNA Sequenz.

Die in Fig. 1 dargestellte DNA Sequenz lässt sich von Position 64 bis Position 3461 vollständig in eine Aminosäuresequenz translatieren. Die Aminosäurereste sind entsprechend ihrem Einbuchstabencode dargestellt.

30 Fig. 3: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel mit unterschiedlich vorbehandelter DNA von AA281296.

Die Abbildung zeigt ein Ethidiumbromid-gefärbtes 0,8%iges Agarosegel. In den Spuren 1 und 8 sind zwei verschiedene DNA Größenstandards aufgetragen, wobei die DNA Fragmentlängen 3, 2, 0.5 und 0.4 kb hervorgehoben sind. Die AA281296 DNA in pT7T3D wurde mit den Restriktionsenzymen Eco RI /Not I (Spur 3), Pst I (Spur 6) und Xho 1 (Spur 7) verdaut. Auf die Spur 2 wurde unverdaute DNA von AA281296 in pT7T3D aufgetragen. In den Spuren 4 und 5 wurde 1/10 eines PCR-Ansatzes (1 Minute 94°C, 2 Minuten 60°C, 3 Minuten 72°C) mit der hTC cDNA in pT7T3D und den Primern 1 (5' GAGTGTGTACGTC-GTCGAGCTGCTCAGGTC 3') und 4 (5' CACCCTCGAGGTGAGACGCTCGGCC 3') [Spur 4] bzw. mit den Primern 6 (5' GCTCGTAGTTGAGCACGCTGAACAGTG 3') und 7 (5' GCCAAGTTCTGCCTGGCTGATGAG 3') [Spur 5] appliziert.

15 Fig. 4: Ausschnitt aus einem Proteinsequenzvergleich der katalytischen Telomerase-Untereinheiten von *Euploites* p123 (p123) und Mensch (phTC).

20 Die Bedingungen (Ktuple, Gap Penalty und Gap Length Penalty) für den in dieser Abbildung dargestellten Lipman-Pearson Proteinvergleich mit der Lasergene Programmsoftware (Dnastar, Inc.) sind aufgelistet. Die Aminosäurereste sind entsprechend ihrem Einbuchstabencode dargestellt. Die zwischen p123 von *Euploites aediculatus* und dem identifizierten EST₊ identischen Aminosäuren sind ebenfalls durch den entsprechenden Buchstaben aus dem Einbuchstabencode hervorgehoben. Nicht identische, aber in der Funktion ähnliche oder vergleichbare Aminosäuren sind durch ein : gekennzeichnet.

25 Fig. 5: Ausschnitt aus einem Proteinsequenzvergleich der katalytischen Telomerase-Untereinheiten von *Euploites* p123 (p123), und Hefe (est2p).

30 Die Bedingungen (Ktuple, Gap Penalty und Gap Length Penalty) für den in dieser Abbildung dargestellten Lipman-Pearson Proteinvergleich mit der Lasergene Programmsoftware (Dnastar, Inc.) sind aufgelistet. Die Aminosäurereste sind entsprechend ihrem Einbuchstabencode dargestellt. Die zwischen

5 p123 von *Euplotes aediculatus* und est2p von Hefe identischen Aminosäuren sind ebenfalls durch den entsprechenden Buchstaben aus dem Einbuchstabencode hervorgehoben. Nicht identische, aber in der Funktion ähnliche oder vergleichbare Aminosäuren sind durch ein : gekennzeichnet.

10

Fig. 6: Ausschnitt aus einem Proteinsequenzvergleich der katalytischen Telomerase-Untereinheiten von Hefe (est2p) und Mensch (phTC).

15

15

Die Bedingungen (Ktuple, Gap Penalty und Gap Length Penalty) für den in dieser Abbildung dargestellten Lipman-Pearson Proteinvergleich mit der Lasergene Programmsoftware (Dnastar, Inc.) sind aufgelistet. Die Aminosäurereste sind entsprechend ihrem Einbuchstabencode dargestellt. Die zwischen est2p von Hefe und dem identifizierten EST₊ identischen Aminosäuren sind ebenfalls durch den entsprechenden Buchstaben aus dem Einbuchstabencode hervorgehoben. Nicht identische, aber in der Funktion ähnliche oder vergleichbare Aminosäuren sind durch ein : gekennzeichnet.

Fig. 7: Ausschnitt aus einem Proteinsequenzvergleich der katalytischen Telomerase-Untereinheiten von *Euplotes* p123 (p123), Hefe (est2p) und Mensch (phTC).

20

25

30

Der in der Fig. 5 dargestellte Vergleich zwischen *Euplotes* p123 (p123), Hefe (est2p) und Mensch (phTC) wurde mit dem Clustal Method Subprogramm der Lasergene Programmsoftware (Dnastar, Inc.) unter Standardbedingungen durchgeführt. Die Aminosäurereste sind entsprechend ihrem Einbuchstabencode dargestellt. Die zwischen est2p von Hefe, p123 von *Euplotes aediculatus* und dem identifizierten EST₊ identischen Aminosäuren sind ebenfalls durch den entsprechenden Buchstaben aus dem Einbuchstabencode hervorgehoben. Zusätzlich sind die Bereiche, die zwischen allen drei Proteinen identisch sind, durch einen hellgrauen Balken oberhalb der Proteinsequenz gekennzeichnet.

Fig. 8: Generierte DNA Sequenz aus Beispiel 6 (RACE Runde 1).

Fig. 9: Generierte DNA Sequenz aus Beispiel 6 (RACE Runde 2).

Fig. 10: Generierte DNA Sequenz aus Beispiel 6 (RACE Runde 3).

5

Fig. 11: Generierte DNA Sequenz aus Beispiel 8 (RACE Runde 3).

10

Fig. 12: Übersicht zur Klonierung der vollständigen hTC cDNA. Die Positionen der Start- und Stopcodons sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Die schwarzen Bereiche der Rechtecke symbolisieren für Protein kodierende Sequenzabschnitte, während die hellgrauen Bereiche 5' und 3' untranslatierte cDNA Regionen symbolisieren bzw. für Intronsequenzen stehen. Die dunkelgrauen Blöcke im Rechteck für die Full length cDNA stehen entweder für das Telomerase-spezifische Motiv (T), oder für die sieben Reverse Transkriptase Motive (Nummer 1-7).

15

20

25

30

Die DNA-Fragmente, die zur Darstellung der vollständigen hTC cDNA notwendig sind, sind ebenfalls als Rechtecke dargestellt und entsprechend ihrer Herkunft gekennzeichnet. Alle Rechtecke sind in ihrer Position relativ zueinander angeordnet. Die Herkunft des DNA-Fragments, für das das Rechteck AA261296 steht, ist in Beispiel 2 beschrieben. Die relative Position der 182 bp Deletion in diesem Fragment (vergleiche Beispiel 2) ist durch eine Lücke im Rechteck gekennzeichnet. Die Herkunft der DNA-Fragmente, für die die Rechtecke RACE1, RACE2 und RACE3 stehen, sind in Beispiel 6 beschreiben. Die Herkunft des DNA-Fragments, für das das Rechteck C5F-Fragment steht, ist in Beispiel 7 beschreiben. Die Herkunft des DNA-Fragments, für das das Rechteck Lambda12 steht, ist in Beispiel 9 beschreiben. Der 3' Teil in dem DNA-Fragment Lambda 12, der für eine nicht mit hTC in Verbindung stehende cDNA codiert (vergleiche Beispiel 9), ist in dieser Abbildung nicht dargestellt. Die vollständige hTC-cDNA Sequenz wurde unter Verwendung der in dieser Abbildung dargestellten DNA-Fragmente Lambda 12 und C5F an den 5' und 3' Splicesstellen

zusammengefügt (vergleiche Beispiel 7) Diese Splicestellen wurden in diversen Fragmenten identifiziert (RACE 1, RACE 3, Lambda 12 und C5F).

5

Fig. 13: Detailausschnitte aus einem Proteinsequenzvergleich der katalytischen Telomerase-Untereinheiten von *Euplotes* und Mensch (hTC).

Die Abbildung zeigt Ausschnitte aus einem Proteinsequenzvergleich zwischen den katalytischen Telomerase-Untereinheiten von *Euplotes* und Mensch (hTC). In den umrandeten Boxen sind die Motive für die Reverse Transkriptase hervorgehoben. Die Ziffern unter den Umrandungen beziehen sich auf die jeweilige Aminosäureposition in der Fig. 2. Die Aminosäurereste sind entsprechend ihrem Einbuchstabencode dargestellt. Identische Aminosäuren sind fett gedruckt. In der Konsensussequenz für das Reverse Transkriptase (RT consensus)-Motiv steht h für eine hydrophobe Aminosäure und p bezeichnet eine polare Aminosäure. Sind diese Gruppen von Aminosäuren in der Aminosäuresequenz von *Euplotes* und hTC erhalten, sind p bzw. h fettgedruckt. Sehr hoch konservierte Aminosäuren sind grau unterlegt. In RT3 ist die umrandete Box erweitert, um zusätzliche homologe Aminosäuren zu erfassen. Das Telomerase-spezifische Motiv ist in Beispiel 9 beschrieben.

Fig. 14: Generierte DNA-Sequenz aus Beispiel 11 (3' Variante). Der nicht zu der in Fig. 1 dargestellten DNA-Sequenz homologe Bereich ist fett hervorgehoben.

25

Fig. 15: hTC Expression in Krebszelllinien und in normalem humanen Gewebe. Abb. A: Auf dem Northern-Blot wurden nach Angaben des Herstellers (Fa. Clontech) etwa 2 µg poly A⁺ RNA aus verschiedenen humanen Zelllinien immobilisiert. Im einzelnen stammte die RNA aus einem Melanom (G361), einem Lungenkarzinom (A549), aus einem Adenokarzinom des Kolons

30

5

(SW480), aus einem Burkitt Lymphom Raji, aus einer Leukämie Zelllinie (MOLT-4), aus einer chronischen Leukämie Zelllinie (K-562), aus einem Cervixtumor (HeLa) und aus der Leukämie Zelllinie HL60. Die gekennzeichneten 4,4 kb, 6 kb und 9,5 kb Transkripte sind spezifisch für hTC (vergleiche Beispiel 10). Abb. B: Auf dem Northern-Blot wurden nach Angaben des Herstellers (Fa. Clontech) etwa 2 μ g poly A⁺ RNA aus verschiedenen humanen Geweben immobilisiert. Im einzelnen wurde die RNA aus Herz, Gehirn, Plazenta, Lunge, Leber, Skelettmuskulatur, Niere und Pankreas isoliert. Ein RNA-Größenstandard ist dargestellt.

10

15

20

25

30

Fig. 16: Western-Blot Analyse der Kaninchenserien gegen Peptide aus der humanen Telomerase-Aminosäuresequenz (Beispiel 12). Jeweils 20 μ l der bakteriellen Lysate aus Beispiel 13 wurden unter zuhilfenahme der Antiseren aus Beispiel 12 in einem Western-Blot (Ausubel *et al.*, 1987) analysiert. In den Spuren 1, 2, 6 und 7 wurden Lysate aus Bakterien, die das pMALEST-Konstrukt beinhalteten, aufgetragen. In den Spuren 3, 4, 8 und 9 wurden Lysate aus Bakterien, die das pMALA1-Konstrukt beinhalteten, aufgetragen. In den Spuren 1, 3, 6 und 8 sind Lysate aus nicht mit IPTG (Isopropyl-beta-thiogalaktopyranosid) induzierten Bakterien aufgetragen. In den Spuren 2, 4, 7 und 9 sind Lysate aus mit IPTG induzierten Bakterien aufgetragen. In der Spur 5 wurde ein Standardgrößenmarker (10 kDa Protein-Leiter der Firma Life Technologies, Kat. Nr. 10064-012) aufgetragen. Die 50 kDa- und 120 kDa-Banden sind am Rande der Membranen gekennzeichnet. Die PVDF-Membran in der Abb. A mit den Spuren 1 bis 4 wurde mit Preimmunserien gegen das Peptid B (vergleiche Beispiel 12) inkubiert. Die PVDF-Membran in Abb. B mit den Spuren 6 bis 9 wurde mit Preimmunserien gegen das Peptid C (vergleiche Beispiel 12) inkubiert. Die PVDF-Membran in der Abb. B mit den Spuren 1 bis 4 wurde mit Immunserien gegen das Peptid B (vergleiche Beispiel 12) inkubiert. Die PVDF-Membran in Abb. B mit den Spuren 6 bis 9 wurde mit Immunserien gegen das Peptid C (vergleiche Beispiel 12) inkubiert.

Fig. 17: Autoradiogramm von ^{35}S -markiertem, *in vitro* translatiertem Protein. In der Spur 1 wurde das vollständige *in vitro* translatierte hTC aufgetragen (vergleiche Beispiel 15). In der Spur 2 wurde eine C-terminal verkürzte Version von phTC aufgetragen. Die Spur 3 zeigt eine vom Hersteller (vergleiche Beispiel 15) gelieferte Positivkontrolle für die *in vitro* Translation. Zur Abschätzung der Proteingrößen ist auf der rechten Seite ein Proteingrößenstandard gekennzeichnet.

Fig 18: Autoradiogramm von ^{32}P -markierten Produkten aus dem TRAP-Assay (vergleiche Beispiel 15). In den Spuren 1 und 2 wurde als Negativkontrolle ein TRAP-Assay Ansatz ohne Zugabe von Enzym oder Protein aufgetragen. In den Spuren 3 und 4 wurde als Positivkontrolle ein TRAP-Assay-Ansatz mit partiell aufgereinigter humaner Telomerase aus HeLa-Zellen aufgetragen. In den Spuren 5 und 6 wurde ein TRAP-Assay-Ansatz mit *in vitro* translatiertem phTC unverdünnt aufgetragen. In den Spuren 7 und 8 wurde ein TRAP-Assay Ansatz mit *in vitro* translatiertem phTC in einer 1:4 Verdünnung aufgetragen. In den Spuren 9 und 10 wurde ein TRAP-Assay Ansatz mit *in vitro* translatiertem phTC in einer 1:16 Verdünnung aufgetragen. In den Spuren 11 und 12 wurde als Negativkontrolle ein TRAP-Assay Ansatz mit *in vitro* translatierter Luziferase aufgetragen.

Fig 19: Autoradiogramm von ^{32}P -markierten Produkten aus dem direkten Telomerase Assay (vergleiche Beispiel 15). In der Spur 1 wurde ein radioaktiv markierter 10 bp-Marker aufgetragen. In der Spur 2 wurde ein 5' radioaktiv markiertes Telomeroligonukleotid ($[\text{TTAGGG}]_3$) aufgetragen. Bei der Spur 3 handelt es sich um eine leere Spur. In der Spur 4 wurde als Positivkontrolle partiell aufgereinigte humane Telomerase aus HeLa-Zellen im direkten Assay verwendet und das Syntheseprodukt aufgetragen. In der Spur 5 wurde das *in*

vitro translatierte phTC aus Beispiel 15 im direkten Assay verwendet und das Syntheseprodukt aufgetragen.

Beispiele

Beispiel 1

5 Es wird heute angenommen, daß weniger als 5 % des humanen Genoms tatsächlich transkribiert und in Protein translatiert werden. Durch die gezielte Untersuchung dieser kodierenden Genomanteile könnten bereits vor der kompletten Sequenzierung des Genoms wichtige Informationen über die 60 000 - 70 000 Gene in einer humanen Zelle gewonnen werden. Die Automatisierung der Hochdurchsatz-DNA-Sequenzier-
10 technologie in den letzten 10 bis 15 Jahren ermöglichte es, viele cDNAs aus Plasmid- cDNA-Bibliotheken unterschiedlichsten Ursprungs zu sammeln und das jeweilige 5'- bzw. 3'-Ende zu sequenzieren. Diese typischerweise 300 bis 400 bp kurzen DNA- Sequenzen werden „Expressed Sequence Tags“ oder kurz ESTs genannt und sind in verschiedenen spezialisierten Datenbanken zusammengefaßt. Der EST-Ansatz wurde
15 zuerst von Okubo *et al.* (1992) beschrieben und von Adams *et al.* (1992) auf einen größeren Maßstab übertragen. Gegenwärtig sind etwa 50 000 Gene aus humanen Zellen teilweise sequenziert und als EST-Eintragung dokumentiert.

20 Durch den Vergleich mit DNA- und Aminosäuresequenzen bekannter Gene können verwandte, aber bislang unbekannte Gene in diesen EST-Datenbanken identifiziert werden (Gerhold and Caskey, 1996). Ein Suchalgorithmus, der sich hierfür besonders bewährt hat, ist das tBLASTn (Altschul *et al.*, 1990). Dieser Algorithmus translatiert jede DNA-Sequenz in der EST-Datenbank in alle sechs möglichen Leserahmen und vergleicht diese Aminosäuresequenzen mit der bekannten Proteinsequenz.

25 Mit der kürzlich publizierten Proteinsequenz für die katalytische Telomerase-Untereinheit aus *Euplotes aediculatus*, p123 (Lingner *et al.*, 1997), wurde die EST-Datenbank am National Center for Biotechnology Information (NCBI) durchsucht. Als Resultat wurde ein humaner EST mit der Accession Nummer AA281296 identifiziert, der im Leserahmen +1 eine signifikante Homologie zu p123 aufweist. Diese
30

Aminosäuresequenz mit dem Leserahmen +1 wird im folgenden als EST₊₁ bezeichnet.

Die Homologie zwischen p123 und dem EST₊₁ ist am auffälligsten in zwei 5 Sequenzbereichen, die durch 30 Aminosäuren getrennt sind. Der längere Sequenzbereich, der sich bei p123 von Aminosäure 438 bis 484 erstreckt, ist zu 38% identisch zu dem korrespondierenden Bereich im EST₊₁. Werden auch ähnliche Aminosäuren berücksichtigt, liegt die Übereinstimmung sogar bei 59%. Der zweite 10 Homologieblock erstreckt sich im p123-Protein von Aminosäure 513 bis 530 und weist eine 44%ige Identität zu dem entsprechenden Sequenzabschnitt im identifizierten EST₊₁ auf. Unter Berücksichtigung von Aminosäureresten mit ähnlichen Eigenschaften findet sich eine Überstimmung von 61%.

Ein wichtiger Parameter zur Beurteilung einer BLAST-Suche ist der Wert P 15 (Probability). P gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein spezifisches Segmentpaar auch in einer BLAST-Suche mit einer Zufallssequenz gefunden würde und bewegt sich numerisch zwischen 0 (Resultat hoch signifikant) und 1 (Ergebnis ohne Bedeutung). So verlief z.B. der Vergleich des p123 Äquivalents aus Hefe (est2p) mit der NCBI-EST-Datenbank negativ: Der gefundene EST hatte eine 20 Wahrscheinlichkeit von P=1 (Tab. 1). Dagegen weist das humane Telomerase- assoziierte Protein 1 (hTP1), das in einer der Allgemeinheit nicht zugänglichen EST- Datenbank gefunden wurde (Harrington *et al.*, 1997), eine Wahrscheinlichkeit von P=0.004 auf.

bekanntes Gen (Spezies)	P	identifiziertes Gen	Ursprung der cDNA Bi- bliothek
est2p (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	0.999	Ratten EST	Niere
p80 (<i>Tetrahymena thermophilia</i>)	0.004	hTP1 (Harrington <i>et al.</i> , 1997)	Krypten des Darmepithels
p123 (<i>Euploites ae-</i>	$3.5 \cdot 10^{-6}$	AA281296	Keimzentren der Tonsillen

<i>diculatus)</i>				
-------------------	--	--	--	--

Tab. 1: Vergleich dreier tBlastn-Suchläufe mit verschiedenen bekannten Genen.

Der durch den Vergleich mit p123 identifizierte humane EST AA281296 hat eine Wahrscheinlichkeit von $P=3.5 \times 10^{-6}$.

Diese Daten legen nahe, daß der identifizierte EST aller Wahrscheinlichkeit nach für ein Fragment der katalytischen Untereinheit der humanen Telomerase kodiert. Daher wird das korrespondierende Gen im folgenden mit hTC (human Telomerase, catalytic) und das abgeleitete Protein mit pHTC abgekürzt.

Beispiel 2

Der durch den Vergleich mit p123 identifizierte EST wurde am 2. April 1997 in die EST-Datenbank eingespeist und ist in keiner Zeitschrift publiziert. Die cDNA-Bibliothek, in welcher dieser EST-Klon vorliegt, wurde laut Angaben des National Center for Biotechnology Information wie folgt hergestellt:

Nach Präparation der mRNA aus den Keimzentren der Tonsillen wurde eine cDNA-Synthese durchgeführt und die doppelsträngigen cDNA-Fragmente gerichtet über die Restriktionsenzymschnittstellen Not I und Eco RI in den Vektor pT7T3D-Pac kloniert.

Die Sequenzierung der in die EST-Datenbank eingespeisten 389 bp erfolgte über den -28m13 rev2-Primer der Firma Amersham (DNA-Sequenz siehe Fig. 1 Position 1685 bis 2073).

Unter Verwendung der Lasergene Programmsoftware (Dnastar Inc.) wurde die DNA-Sequenz von EST AA281296 entsprechend des humanen genetischen Codes

translatiert. Die resultierende Aminosäuresequenz (EST_{+1}) entspricht der Position 542 bis 670 in Fig. 2.

Die abgeleitete Proteinsequenz von EST_{+1} setzt sich aus 129 Aminosäuren zusammen, darunter 27 basische, 11 saure, 51 hydrophobe und 28 polare 5 Aminosäurereste.

Der in Beispiel 1 identifizierte EST (AA 281296) wurde kommerziell von der Research Genetics, Inc. (Huntsville) in Form eines in *E. coli* transformierten 10 Plasmids erworben und experimentell analysiert:

Wie in dem Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel der Fig. 3 gezeigt, wird nach Restriktionsverdau der hergestellten Plasmid DNA vom EST AA 281296 ein etwa 2,2 kb großes Fragment aus dem Vektor pT7T3D freigesetzt. Anhand einer parallel 15 durchgeföhrten Polymeraseketten- (PCR) -Reaktion mit spezifischen internen Primern wurde der EST AA281296 überprüft. : Die Länge der erwarteten PCR Produkte liegt bei 325 und 380 bp und stimmt mit der Länge der experimentell gefundenen Fragmente überein (vergl. Spur 4 und 5 in Fig.3). Damit konnte gezeigt werden, daß der vom Research Genetics, Int. (Huntsville) zugesandte *E.coli*-Klon 20 den identifizierten EST als Plasmid beinhaltet.

Nach DNA-Präparation wurden die insgesamt 2176 bp des Inserts durch Doppelstrangsequenzierung identifiziert. Ein Sequenzvergleich des Klons AA281296 mit der DNA-Sequenz des CSF-Fragments (vergleiche Beispiel 7) ergab, daß eine 25 182 bp Deletion vorliegt (Position 2352 bis 2533, Fig. 1) und sich somit der offene Leserahmen in diesem Bereich verschiebt. Zusammenfassend setzt sich die DNA-Sequenz von Klon AA281296 somit aus den Sequenzinformationen der Fig. 1 (Position 1685 bis 2351 und Position 2534 bis 4042) zusammen.

Im tBLASTn Vergleich werden nur die Bereiche mit den höchsten Übereinstimmung zwischen p123 und EST₊₁ identifiziert (Aminosäuren 438-530, in p123), wogegen die dazwischenliegenden Aminosäuren nicht berücksichtigt werden.

5 Um Aussagen über die Verwandtschaft der Proteinsequenzen über einen größeren Bereich (Aminosäuren 437-554, in p123) zu treffen, wurde ein „Lipman-Pearson Proteinvergleich“ durchgeführt (siehe Fig. 4). Hierbei wurden 34% identische Aminosäuren bzw. 59% Aminosäuren, die entweder identisch oder biochemisch ähnlich sind, gefunden. Dieses Ergebnis zeigt, daß sich auch außerhalb der mit dem tBLASTn gefundenen Homologiebereiche die Verwandtschaft zwischen diesen Proteinen fortsetzt.

10 Wie kürzlich berichtet (Lingner *et al.*, 1997), sind p123 aus *Euplotes aediculatus* und est2p aus *Saccharomyces cerevisiae* zueinander homolog. Um den Grad der Verwandtschaft zwischen p123 und est2p ins Verhältnis zu der hier beschriebenen Homologie zwischen p123 und EST₊₁ zu stellen, wurde die oben beschriebene Region von p123 (Aminosäuren 437-554) mit Hilfe des Lipman-Pearson Proteinvergleichs unter Verwendung identischer Parameter auch mit est2p verglichen. Dabei zeigte sich, daß p123 und est2p in diesem ausgewählten Bereich zu 20 21% identisch sind bzw. 22% identische Aminosäuren oder biochemisch ähnliche Aminosäurereste aufweisen (siehe Fig. 5). Demnach ist die Homologie zwischen EST₊₁ und dem p123 von *Euplotes* signifikant höher als zwischen die p123 und est2p.

25 **Beispiel 4**

30 Die Homologie von p123 zu EST₊₁ und est2p legt die Schlußfolgerung nahe, daß alle 3 Proteine zur gleichen Proteinfamilie gehören. Um diese Annahme zu bestätigen, wurde est2p unter den in Beispiel 3 erwähnten Bedingungen mit EST₊₁ verglichen (siehe Fig. 6). Dabei zeigte sich, daß EST₊₁ 20% Identität zu est2p hat, also eine vergleichbare Homologie wie p123 zu est2p aufweist. Diese

vergleichsweise geringe Übereinstimmung bestätigt auch den Befund, daß in der tBLASTn-Suche mit est2p kein signifikanter EST identifiziert wurde (siehe Beispiel 1).

5 Beispiel 5

Um für die Proteinfamily der katalytischen Telomerase-Untereinheiten aus verschiedenen Spezies wichtige, unter Umständen funktionelle Domänen, zu identifizieren, wurde ein Computervergleich mit p123, est2p und phTC durchgeführt (siehe Fig. 7).
10 Bei dieser Analyse fallen insbesondere zwei Bereiche auf, die in allen drei Proteinen enthalten sind (siehe Fig. 7). Dem Bereich, der bei p123 den Aminosäuren 447 bis 460 entspricht (Fig. 13, Telomerase Motiv) kann gegenwärtig keine eindeutige Funktion zugeordnet werden. Eine Motiv-Suche mit dem „Wisconsin Sequence Analysis Package“ von der „Genetics Computer Group“ (GCG) und eine Suche in einer Protein-Datenbank (Swissprot, Ausgabe vom 8.6.1997) ergaben keine signifikanten Erkenntnisse.
15

Dagegen weist ein zweiter, zwischen p123, est2p und phTC homologer Bereich, der bei p123 den Aminosäuren 512-526 entspricht, ein Konsensus-Motiv für eine Reverse Transkriptase (RT) auf (Fig. 7 und 13). Lingner *et al.* (1997) konnten zeigen, daß p123/est2p insgesamt 6 solcher RT-Motive enthalten, die für die katalytische Funktion von p123/est2p essentiell sind. Wie in Fig. 7 und 13 dargestellt, sind in der untersuchten Sequenz von phTC auch zwei solcher RT-Motive konserviert. Hierbei handelt es sich um die RT-Motive, welche bei p123/est2p am weitesten N-terminal lokalisiert sind (Lingner *et al.*, 1997).
25

Die Primärsequenzen von Reversen Transkriptasen sind stark divergent; nur wenige Aminosäuren sind innerhalb eines separaten Motivs vollständig konserviert (Poch *et al.*, 1989 und Xiong and Eickbush, 1990). Außerdem unterscheiden sich Reverse Transkriptasen, die von Retroviren oder Long Terminal Repeat (LTR) 30 Retrotransposons kodiert werden, durch verschiedene Abstände zwischen den

konservierten RT-Motiven von solchen Reversen Transkriptasen, die von Nicht-LTR Retrotransposons oder der Gruppe II Introns kodiert werden (Xiong and Eickbush, 1990). Entsprechend des Aufbaus ihrer RT-Motive sind p123, est2p und phTC letzterer RT-Gruppe zuzuordnen. Interessanterweise entsprechen dabei die Konsensussequenzen der RT-Motive in phTC am genauesten dem postulierten RT-Konsensus-Motiv: Von acht Aminosäureresten innerhalb der zwei RT-Motive sind bei phTC 6, bei p123 und est2p hingegen nur 5 Aminosäuren zu finden (Fig. 7 und 13). Auffällig sind hierbei insbesondere die hydrophoben Aminosäuren wie Leucin und Isoleucin sowie die Aminosäuren Lysin und Arginin in bestimmten Positionen (Fig. 7 und 13).

Zusammenfassend konnte hiermit auf deskriptiver Ebene gezeigt werden, daß der aufgrund seiner Homologie zu p123 identifizierte Klon AA281296 ein Fragment der katalytischen Untereinheit der humanen Telomerase darstellt.

15

Beispiel 6

Zur Klonierung des 5'-Endes der hTC-cDNA wurden zusätzlich zu dem in Beispiel 8 aufgeführten Homologiescreening drei aufeinanderfolgende RACE (rapid amplification of cDNA ends)-Reaktionen durchgeführt. Als cDNA-Quelle wurde Marathon-Ready cDNA (Fa. Clontech) aus der humanen Leukämiezelllinie K562 bzw. aus humanem Testisgewebe eingesetzt. Nachfolgend ist die Durchführung sowie das Ergebnis der einzelnen RACE-Runden beschrieben.

25 Darüberhinaus wurden die Sequenzinformationen der RACE-Runden genutzt, um per PCR die Einzelfragmente als einen zusammenhängenden cDNA-Klon zu amplifizieren.

RACE-Runde 1:

In einem Endvolumen von 50 μ l wurden 5 μ l K562 Marathon-Ready cDNA (Fa. Clontech, Katalognummer 7441-1) mit 10 pmol dNTP-Mix versetzt und in 1 x Klen Taq PCR-Reaktionspuffer und 1 x Advantage Klen Taq Polymerase Mix (Fa. Clontech) eine PCR-Reaktion durchgeführt. Als Primer wurden 10 pmol des internen 5
genspezifischen Primers GSP2 (5'-GCAACTTGCTCCAGACACTCTTCCGG-3') aus dem 5'-Bereich des hTC-EST-Klons sowie 10 pmol des Marathon Adaptor 10 Primers AP1 (5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3'; Fa. Clontech) zugefügt. Die PCR wurde in 4 Schritten durchgeführt. Nach einer einminütigen Denaturierung bei 94°C wurde über 5 Zyklen für 30 sec bei 94°C denaturiert und anschließend für 4 min bei 72°C die Primer angelagert und die DNA-Kette verlängert. Es folgten 5 Zyklen, bei denen für 30 sec die DNA bei 94°C denaturiert wurde, die anschließende Primerverlängerung aber für 4 min bei 70°C erfolgte. Abschließend wurden dann 22 Zyklen durchgeführt, bei denen nach den 30 sec DNA-Denaturierung die Primeranlagerung und Kettenverlängerung für 4 min bei 15 68°C stattfand.

Im Anschluß an diese PCR wurde das PCR-Produkt 1:50 verdünnt. Fünf μ l dieser Verdünnung wurden in einer zweiten „nested“ PCR zusammen mit 10 pmol dNTP-Mix in 1 x Klen Taq PCR-Reaktionspuffer und 1 x Advantage Klen Taq Polymerase-Mix sowie 10 pmol des Primers GSP2 und 10 pmol des „nested“ Marathon Adaptor 20 Primers AP2 (5'-ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC-3'; Fa. Clontech) eingesetzt. Die PCR-Bedingungen entsprachen den in der ersten PCR gewählten Parametern. Als einzige Ausnahme wurden im letzten PCR-Schritt statt 22 Zyklen nur 16 Zyklen gewählt.

25

Als Produkt dieser Nested-RACE-PCR wurde ein 1153 bp langes DNA-Fragment erhalten. Dieses wurde in den TA-Cloning Vektor pCR2.1 der Fa. InVitrogen kloniert und vollständig doppelsträngig sequenziert (Fig. 8).

30

Die Nukleotide 974 bis 1153 repräsentieren die in Fig. 1 dargestellte Nukleotidregion 1629 bis 1808 der hTC-cDNA. Bei dem von bp 1-973 reichenden Nukleotidbereich, der keine Homologie zu der in Fig. 1 gezeigten hTC-cDNA-Sequenz aufweist, handelt es sich um Intronsequenzen des hTC-Gens (Daten nicht gezeigt). Eine 3'-

Splice-Konsensussequenz ist am Exon-Intron-Übergang zu finden. Die Präsenz von Intronsequenzen könnte auf unvollständig gespliekte mRNA als Ausgangssubstanz für die cDNA-Synthese zurückzuführen sein. Auch genomische DNA-Kontaminationen in der cDNA könnten das Auffinden von Intronsequenzen erklären.

5

RACE-Runde 2:

Basierend auf den Sequenzdaten der ersten RACE-Runde wurde eine zweite RACE mit dem genspezifischen Primer GSP5 aus der 5'-Region von RACE-Produkt 1 (5'-GGCAGTGACCAGGAGGCAACGAGAGG-3') sowie dem AP1-Primer durchgeführt. Als cDNA-Quelle wurde Marathon-Ready cDNA aus humanem Testis (Fa. Clontech; Katalognummer 7414-1) verwendet. Es wurden gleiche PCR-Bedingungen wie bei der 1. PCR in RACE-Runde 1 gewählt. Auch in RACE-Runde 2 wurde an die 1. PCR eine 2. „nested“ PCR mit verdünntem PCR-Produkt als cDNA-Quelle angeschlossen. Als „nested“ PCR-Primer wurden der genspezifische Primer GSP6 aus der 5'-Region von RACE-Produkt 1 (5'-GGCACACTCGGCAGGAAACGCACATGG-3') sowie der AP2-Primer genutzt. Die Bedingungen entsprachen den Parametern der Nested-PCR aus RACE-Runde 1.

20 Das 412 bp lange PCR-Produkt der Nested-PCR aus RACE-Runde 2 wurde in den TA-Cloning Vektor pCRII-Topo der Fa. Invitrogen kloniert und vollständig sequenziert (Fig. 9). Der Sequenzabschnitt von bp 267 bis bp 412 ist komplett homolog zu dem 5'-Bereich des Produktes aus RACE 1. Die Region von bp 1 bis bp 266 verlängert RACE-Produkt 1 am 5'-Ende. Bei diesem RACE-Produkt 2 handelt es sich wahrscheinlich komplett um einen Intronbereich des hTC-Gens (Daten nicht gezeigt).

RACE-Runde 3:

30

Eine dritte RACE-Runde führte zur Identifizierung von weiter 5'-gelegenen hTC-cDNA-Regionen. Ausgehend von den Sequenzergebnissen der RACE-Runde 2 wurde ein genspezifischer Primer GSP9 (5'-CCTCCTCTGTTCACTGCTCTGGCC-3') aus dem 5'-Bereich des RACE-Produkts 2 gewählt und zusammen mit dem AP1-Primer und Marathon-Ready cDNA aus humanem Testis (Fa. Clontech) in einer neuen RACE eingesetzt. Die RACE-Bedingungen glichen denen der 1. PCR in RACE 1 und 2. In der nachfolgenden „nested“ RACE, die, entsprechend der „nested“-RACE in Runde 1 und 2, mit dem genspezifischen Primer GSP 10 aus dem 5'-Bereich von RACE-Produkt 2 (5'-CGTAAGTTATGCAAACTGGACAGG-3') und AP2 erfolgte, wurde ein 1012 bp langes Fragment (Fig. 10) amplifiziert und in den TA-Cloning Vektor pCRII-TOPO kloniert. Die nachfolgende Sequenzierung zeigte, daß die 3'-Region dieses RACE-Fragments (bp 817 - bp 1012) offensichtlich noch Intronsequenz des hTC-Gens darstellt. Komplett homolog zur 5'-Region von RACE-Produkt 2 ist der Bereich von bp 889-1012. Dagegen ist der 5'-Bereich dieses 10 Fragments von bp 1-bp 816 identisch mit der in Fig. 1 gezeigten Region von bp 814 - bp 1629 der hTC-cDNA. Eine potentielle 5'-Splice-Konsensussequenz ist am Exon-Intron-Übergang zu finden.

20 Beispiel 7

Zur Klonierung eines zusammenhängenden Fragments aus den Sequenzinformationen von RACE 2 und dem Klon AA281296 wurde eine PCR durchgeführt. Als cDNA-Quelle wurde Marathon-Ready cDNA aus humanem Testis (Fa. Clontech; Katalognummer 7414-1) verwendet. Der PCR Ansatz erfolgte wie 25 unter RACE 1 (vergleiche Beispiel 6) beschrieben, allerdings mit den Primern C5F (5'-CGAGTGGACACGGTGATCTCTGCC-3') aus der 5' Region von RACE 2 und dem Primer C3B (5'-GCACACCTTGGTCACTCCAAATTCC-3') aus der 3' Region vom Klon AA281296. Die PCR wurde in 2 Schritten durchgeführt. Nach 30 einer einminütigen Denaturierung bei 94°C wurde über 36 Zyklen für 30 sec bei 94°C denaturiert und anschließend für 4 min bei 68°C die Primer angelagert und die DNA-Kette verlängert.

Als Produkt dieser PCR wurde ein 2486 bp langes DNA-Fragment, im folgenden als C5F-Fragment bezeichnet, erhalten. Dieses wurde in den TA-Cloning Vektor pCRII-TOPO der Fa. Invitrogen kloniert und vollständig doppelsträngig sequenziert. Ein Sequenzvergleich von dem C5F-Fragment mit DNA-Sequenz vom Klon AA281296 ergab, daß zwischen dem RT-Motiv 3 und RT-Motiv 4 eine 182 bp lange in frame Insertion vorliegt (Position 2352 bis 2533, Fig.1). Ein weiterer Vergleich der DNA vom C5F-Fragment mit den Sequenzen der drei RACE-Runden machte deutlich, daß am 3' Ende von C5F ein bereits in RACE 2 identifiziertes Intron vorliegt. Eine 3'-Splice-Konsensussequenz ist am Exon-Intron-Übergang zu finden. Zusammenfassend setzt sich die DNA-Sequenz vom C5F-Fragment somit aus den Sequenzinformationen der Fig. 9 (Position 64 bis 278) und den Sequenzdaten der Fig. 1 (Position 1636 bis 3908) zusammen.

15 **Beispiel 8**

Zur Klonierung des 5'-Endes der hTC-cDNA wurden zusätzlich zu dem in Beispiel 6 aufgeführten RACE-Protokoll ein Homologiescreening (Ausubel *et al.*, 1987) durchgeführt. Als cDNA-Quelle wurde eine humane Erythroleukemia 5'-Stretch Plus cDNA Bibliothek (Fa. Clontech, Kat. Nr. HL5016b) aus der humanen Leukämiezelllinie K562 verwendet. Etwa 3×10^6 Pfu dieser random und oligo dT geprimten Bibliothek wurden wie bei Ausubel *et al.*, (1987) ausplattiert und zum Screening eingesetzt. Als Probe wurde ein 719 bp langes (Position 1685 bis 2404, entsprechend der Fig. 1) radioaktiv markiertes hTC-DNA-Fragment benutzt.

25 Von 20 putativ positiven λ Klonen konnte nach einem Rescreening mit der gleichen hTC-Sonde der λ Klon 12 als positiv verifiziert werden. Nach Plaqueaufreinigung und λ DNA-Präparation (Ausubel *et al.*, 1987) wurde das 4kb Insert in den Vektor pBluescript umkloniert und durchsequenziert (Fig. 11).

30 Ein Vergleich der λ Klon 12-Sequenz mit den Sequenzen der RACE-Klone und der DNA-Sequenz vom Klon AA281296 ergab, daß dieser im Homologie Screening identifizierte Klon für einen 5' Teil der hTC-cDNA kodiert und ein putatives ATG-Startcodon in Position 63 entsprechend der Fig.1 aufweist. 5' von diesem ATG liegt

kein Stopcodon im gleichen Leserahmen vor. Weitere Sequenzanalysen machen deutlich, daß der λ Klon 12 von Position 1656 bis 2004 wahrscheinlich ein Intron enthält. Sehr gut konservierte 5' und 3' Splicestellen belegen diese Hypothese. Die für die hTC-cDNA kodierende Sequenz setzt sich dann von Position 2005 bis 5 Position 2382 fort. Die Sequenz von 2383 bis zum 3' Ende vom λ Klon 12 weist einen auffälligen offenen Leserahmen in Leseraster -4 auf. Eine bioinformatische Analyse der entsprechenden DNA-Sequenz zeigte, daß dieser Leserahmen über etwa 10 400 bp identisch zu diversen ESTs ist, die in keinem Zusammenhang zur hTC-cDNA stehen. Somit handelt es sich bei dem λ Klon 12 um einen chimären Klon, der sich im wesentlichen aus dem 5' Ende der hTC cDNA und einem weiteren cDNA-Klon unbekannter Funktion zusammensetzt.

15 Eine zusammenfassende schematische Darstellung mit der relativen Orientierung der RACE-Produkte und des Homologiescreenings ist in Fig. 12 dargestellt. Die vollständige Sequenz der hTC-cDNA (Fig. 1) wurde aus dem λ Klon 12 (Position 21 bis 1655 entsprechend der Fig. 11), dem PCR-Produkt C5F (Position 1636 bis 3908 entsprechend der Fig. 1) und dem EST AA281296 (Position 3909 bis 4042 entsprechend der Fig. 1) zusammengesetzt.

20 Beispiel 9

25 Durch einen Vergleich der phTC-Proteinsequenz (Fig. 2) mit einer Konsensussequenz von Reversen Transkriptasen (Poch *et al.*, 1989, Xiong and Eickbush, 1990) wurden insgesamt sieben Motive für Reverse Transkriptasen (RT-Motive) identifiziert (Fig. 13). Innerhalb dieser Motive sind einige Aminosäuren nicht nur zwischen der RT-Konsensussequenz und dem phTC, sondern auch im Vergleich zu dem Telomeraseprotein aus *Euplotes* hoch konserviert. So sind z.B. in 30 RT-Motiv 5 zwei Asparaginsäuren (Position 868 und 869 in Fig. 2) völlig konserviert (Fig. 13). Das aus anderen Reverse Transkriptasen abgeleitete RT-Motiv 7 (Poch *et al.*, 1989, Xiong and Eickbush, 1990) wurde nur in der humanen katalytischen Telomeraseuntereinheit aufgezeigt, nicht in dem *Euplotes*-Protein (Fig. 13).

Auffällig sind weiterhin Strukturmerkmale, die sich nur in den Telomeraseproteinen, nicht jedoch in anderen Reverse Transkriptasen aufzeigen lassen. Das Telomerase Motiv (Position 553 und 565 in Fig. 2) ist eine für diese Proteinfamilie spezifische Struktur, da es in keinem bisher bekannten Protein vorkommt. Ein weiteres nur in den katalytischen Telomeraseproteinen identifiziertes Merkmal ist der Abstand zwischen den RT-Motiven 3 und 4, der mit 107 Aminosäuren deutlich größer ist als in anderen RTs. Diese Besonderheiten erlauben die Schlußfolgerung, daß die katalytischen Untereinheiten der Telomerasen aus verschiedenen Spezies wahrscheinlich eine eigene Untergruppe der RNA-abhängigen DNA-Polymerasen darstellt.

Beispiel 10

Die Expression der Telomerase RNA-Untereinheit (hTR) korreliert nicht mit der Telomeraseaktivität, sondern wird ubiquitär beobachtet (Feng *et al.*, 1995). Somit stellt sich die Frage, ob die Ausprägung der katalytischen Telomerase-Untereinheit mit der Telomeraseaktivität einhergeht.

Um das hTC-Expressionslevel zu analysieren, wurden Northern Blot-Experimente (Ausubel *et al.*, 1987) durchgeführt. Die kommerziell erhältlichen Northern Blots waren entweder mit einer Reihe von RNA-Präparationen aus normalem, humanem Gewebe (Fa. Clontech; Katalognummer 7760-1) oder mit RNA-Proben aus humanen Krebszelllinien (Fa. Clontech; Katalognummer 7757-1) bestückt. Als Probe wurde ein 719 bp langes (Position 1685 bis 2404, entsprechend der Fig. 1) radioaktiv markiertes hTC-DNA-Fragment benutzt. Die Inkubation der Membranen mit der Probe erfolgte nach Angaben des Herstellers (Fa. Clontech).

In den acht getesteten humanen Zelllinien (3 Leukämiezelllinien, 3 Carcinomzelllinien, ein Melanom und ein Lymphom) wurden zwei RNA-Haupttranskripte in der Größe von etwa 9,5 kb und 4,4 kb und ein RNA-Nebentranskript von etwa 6 kb nachgewiesen, die mit der Probe kreuzhybridisieren (Fig. 15, Abb. A). Die hTC mRNA wurde im Vergleich am stärksten in den Leukämie Zelllinien K-562 und HL-60 exprimiert (Fig. 15, Abb. A). Im Gegensatz dazu war das hTC-Transkript in den

getesteten normalen Geweben (Herz, Gehirn, Plazenta, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere und Pankreas) nicht nachzuweisen (Fig. 15, Abb. B). Diese Beobachtung ist nicht überraschend, da in diesen Geweben auch keine Telomeraseaktivität nachgewiesen werden konnte (Kim *et al.*, 1994).

5 Diese Daten deuten darauf hin, daß die Induktion der hTC Expression für die Aktivierung der Telomerase während der Tumorentstehung eine wesentliche Rolle spielt.

Beispiel 11

Bei der PCR-Amplifikation der hTC-cDNA-Fragmente aus verschiedenen cDNA-Banken (Marathon Ready cDNA der Fa. Clontech aus der humanen Leukämiezelllinie K562 und aus humanem Testis sowie cDNA aus der humanen prämyeloischen Leukämiezelllinie HL60) wurden stets mehrere PCR-Produkte erhalten, die in ihrer Größe minimal voneinander abwichen. Um die Unterschiede zwischen den verschiedenen hTC-PCR-Produkten aufzuklären, wurde mit den Primern C5A (5'-CCGAAGAGTGTCTGGAGCAAGTTGC-3') und C3B (5'-GCACACCTTGGTCACTCCAAATTCC-) ein von bp 1783 bis bp 3901. 15 reichendes Fragment der in Fig. 1 dargestellten hTC-cDNA amplifiziert. Als cDNA-Quelle wurde Marathon-Ready cDNA aus K562-Leukämiezellen (Fa. Clontech; Katalognummer 7441-1) verwendet (PCR1 und 2). In einer dritten PCR wurde mit den Primern GSP1vor (5'-GGCTGATGAGTGTACGTCGAG-3') und HTRT3A (5'-GGGTGGCCATCAGTCCAGGATGG-3') ein hTC-Fragment von bp 20 1695 bis bp 3463 der hTC-cDNA in Fig. 1 aus HL60-cDNA amplifiziert.

25

Nachfolgend sind die Bedingungen der 3 PCR-Reaktionen beschrieben:

30 In der ersten PCR wurden in einem Endvolumen von 50 µl 5 µl K562 Marathon-Ready cDNA mit 10 pmol dNTP-Mix versetzt und in 1 x Klen Taq PCR-

Reaktionspuffer und 1 x Advantage Klen Taq Polymerase Mix (Fa. Clontech) eine PCR-Reaktion durchgeführt. Je 10 pmol der Primer C5A und C5B wurden zugefügt. Die PCR wurde in 3 Schritten durchgeführt. An eine einminütige Denaturierung bei 94°C schlossen sich 35 PCR-Zyklen an, in denen die DNA zunächst für 30 sec bei 94°C denaturiert wurde und anschließend für 4 min bei 68°C die Primer angelagert und die DNA-Kette verlängert wurde. Zum Abschluß folgte für 10 min eine Kettenverlängerung bei 68°C. Die entstandenen PCR-Produkte wurden in den TA-Cloning Vektor pCRII-TOPO der Fa. InVitrogen kloniert.

10 In einer zweiten PCR wurden 5 µl K562 Marathon-Ready cDNA mit je 10 pmol der Primer C5A und C3B, 10 pmol dNTP-Mix und 2 U Taq-DNA-Polymerase (Fa. Gibco-BRL) versetzt und in einem Endvolumen von 50 µl eine PCR-Reaktion in 1x PCR-Puffer der Fa. Perkin Elmer durchgeführt. Die PCR-Reaktion erfolgte in 3 Schritten. Zunächst wurde die DNA für 3 min bei 94°C denaturiert. Es folgten 34 15 Zyklen, bei denen aufeinanderfolgend die DNA für 45 sec bei 94°C denaturiert wurde, anschließend für 1 min bei 68°C die Primeranlagerung erfolgte und danach für 3 min bei 72°C die DNA-Kette verlängert wurde. Im letzten PCR-Schritt wurde für 10 min bei 72°C eine abschließende Kettenverlängerung durchgeführt. Die entstandenen PCR-Produkte wurden in den TA-Cloning Vektor pCR2.1 der Fa. InVitrogen kloniert.

20 Für die dritte PCR wurde zunächst mit dem cDNA-Synthese-Kit der Fa. Boehringer Mannheim aus 2 µg DNaseI-behandelter Poly A-RNA der humanen prämyeloischen Zelllinie HL60 eine cDNA-Synthese entsprechend den Angaben der Hersteller durchgeführt. In einem Endvolumen von 50 µl wurde anschließend 1 µl dieser HL60-25 cDNA mit je 10 pmol der Primer GSP1 vor und HTRT3A sowie 10 pmol dNTP-Mix gemischt und nach Zusatz von 1,25 µl DMSO in 1 x Klen Taq PCR-Reaktionspuffer und 1 x Advantage Klen Taq Polymerase Mix (Fa. Clontech) eine PCR-Reaktion durchgeführt. Die PCR-Reaktion verlief in 3 Schritten. Nach einer Denaturierung für 3 min bei 94°C wurde über 37 Zyklen die DNA zunächst für 1 min bei 94°C denaturiert und anschließend für 4 min bei 68°C die Primer angelagert und die DNA-Kette verlängert. Abschließend erfolgte noch eine Inkubation für 10 min bei 68°C. Die PCR-Produkte wurden in den TA-Cloning Vektor pCR 2.1-TOPO kloniert.

Die vollständige Doppelstrangsequenzierung der aus PCR 1 und 2 klonierten hTC-cDNA-Fragmente sowie die partielle Sequenzierung der aus PCR 3 erhaltenen hTC-cDNA-Fragmente zeigte, daß zusätzlich zu der in Fig. 1 dargestellten hTC-cDNA 4 Varianten dieser cDNA in humanen Zellen existieren:

5

Variante 1 der humanen hTC-cDNA zeichnet sich durch eine 182 bp lange Deletion der Nukleotide 2345 bis 2526 aus. Durch diese Deletion kommt es zu einer Verschiebung im ORF und es wird ein verkürztes hTC-Protein abgelesen, dem die RT-Motive 4 bis 7 fehlen.

10
15

Variante 2 der humanen hTC-cDNA weist eine 36 bp lange Deletion der Nukleotide 2184 bis 2219 auf. Durch diese Deletion geht das RT-Motiv 3 verloren. Der Leserahmen bleibt jedoch erhalten und es wird ein Protein hergestellt, dem selektiv das RT-Motiv 3 fehlt.

20

Variante 3 der humanen hTC-cDNA stellt eine Kombination der Varianten 1 und 2 dar. Sie weist sowohl eine Deletion der bp 2184 bis 2219 als auch der bp 2345 bis 2526 auf.

25

Variante 4 der humanen hTC-cDNA zeichnet sich durch den Verlust des Nukleotidbereichs von bp 3219 bis 3842 aus. Diese fehlende Sequenz ist durch eine nicht zu hTC homologe Sequenz ersetzt. Ab bp 3843 ist die Sequenz wieder völlig identisch zu der in Fig. 1 dargestellten hTC-Sequenz. Die Sequenz der Variante 4 ist in Fig. 14 dargestellt. Entsprechend des gewählten 5'-Primers beginnt sie mit bp 1783 der in Fig. 1 dargestellten hTC-cDNA. Der nicht-homologe Bereich ist fett hervorgehoben und stimmt von Position 3219 bis Position 3451 (Fig. 14) auf DNA Ebene zu 98,7% mit einem EST (Accession Nr. AA299878) aus einem humanen Uterustumor überein.

30

Beispiel 12

5 Zur Gewinnung von Antiseren mit Spezifität für die katalytische Untereinheit der humanen Telomerase wurde die vorhandene Nukleotidsequenz (Fig. 1) in eine Aminosäuresequenz übersetzt (Fig. 2). Mit Hilfe eines Programms zur Sekundärstrukturvorhersage (PROTEAN, aus dem Softwarepaket DNASTar, DNASTAR Inc., Madison, WI, USA) wurden zwei Peptide ausgewählt, die mit gewisser Wahrscheinlichkeit eine Immunantwort hervorrufen. Es handelt sich um folgende Peptide, die im Einbuchstabencode für Aminosäuren dargestellt sind:

10

B: C-K-R-V-Q-L-R-E-L-S-E-A-E-V-R-Q - CONH₂ / Pos. 594 - 608

C: C-Q-E-T-S-P-L-R-D-A-V-V-I-E-Q-S-S-L-N-E - CONH₂ / Pos. 781-800

15 Die unterstrichenen Cysteine stammen nicht aus der Telomerasesequenz, sondern wurden als Linker für die Kopplung zusätzlich angefügt

20 Die Peptide wurden über das Thiol-reaktive Kopplungsreagenz m-Maleimido-benzoyl-N-Hydroxysuccinimidester (MBS) an Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) gekoppelt. Damit wurden je zwei Kaninchen im Abstand von 2 bis 4 Wochen immunisiert. Vor der Immunisierung wurden 5 ml Blut zur Gewinnung von Preimmunseren entnommen. Nach 4 Immunisierungen wurden ebenfalls 5 ml Blut zur Gewinnung von Immunseren entnommen. Diese Seren wurden in einem Western-Blot Experiment (Ausubel *et al.*, 1987) auf Reaktivität mit Fusionsproteinen (Beispiel 13) getestet.

25

Beispiel 13

Um das Protein der katalytischen Telomerase-Untereinheit analysieren zu können, wurden bakterielle Expressionversuche durchgeführt.

Die Konstrukte für diese Experimente sind im Folgenden beschrieben:

Für das Expressionskonstrukt pMalEST wurde das Insert des in Beispiel 2 erwähnten Klons AA281296 mit den Restriktionsenzymen Eco RI und Not I herausgeschnitten, die Schnittstellen mit dem Klenow-Fragment aufgefüllt (Ausubel *et al.*, 1987) und in den vorgegebenen Leserahmen des Maltose bindenden Proteins des bakteriellen Expressionvektors pMAL-C2 (Fa. New England Biolabs) kloniert. Der Vektor pMAL-C2 wurde mit dem Restriktionsenzym Pst I verdaut und die überstehenden Einzelstrangenden mit der T4 DNA Polymerase entfernt (Ausubel *et al.*, 1987).

Das Expressionskonstrukt pMalA1 beinhaltet die Nukleotidsequenz der Fig. 1 von Position 1789 bis Position 3908. Dieses DNA-Fragment wurde über PCR mit den Primern C5A (5'-ACCGGAAGAGTGTCTGGAGCAAGTTG-3') und C3B (5'-GCACACCTTGGTCACTCCAAATTCC-3') aus einer kommerziell erhältlichen K562 Marathon-Ready cDNA Library (Fa. Clontech, Katalognummer 7441-1) amplifiziert und in TA-Cloning Vektor pCRII-TOPO der Fa. Invitrogen kloniert. Die PCR-Bedingungen wurden wie im Beispiel 7 beschrieben durchgeführt. Für das Expressionskonstrukt pMalA1 wurde das Insert mit dem Restriktionsenzym Eco RI herausgeschnitten, die Schnittstellen mit dem Klenow-Fragment aufgefüllt (Ausubel *et al.*, 1987) und in den mit dem Restriktionsenzym Xmn I geschnittenen bakteriellen Expressionvektors pMAL-C2 (Fa. New England Biolabs) kloniert.

Die Proteinexpression unter Verwendung dieser Konstrukte erfolgte in dem Bakterienstamm *E. coli* DH5 α . Die Expressionsbedingungen erfolgten wie in der Betriebsanleitung der Fa. New England Biolabs (Katalognummer 800) beschrieben. Die hergestellten bakteriellen Lysate wurden in einem Western-Blot Experiment (Ausubel *et al.*, 1987) getestet.

Die bakteriellen Lysate aus Beispiel 13 wurden unter zuhilfenahme der Antiseren aus Beispiel 12 in einem Western Blot (Ausubel *et al.*, 1987) analysiert.

Da der Fusionsanteil für das Maltose bindende Protein etwa 43 kDa groß ist, werden für die Konstrukte pMalEST und pMalA1 Fusionsproteine in der Größe von etwa 74 kDa bzw 106 kDa erwartet.

Im Vergleich der Pre-Immunsäeren mit den Seren nach der ersten Immunisierung wird ersichtlich, daß spezifische Antikörper gegen die Epitope B und C gebildet wurden (Fig. 16). Darüberhinaus wurden neben den erwarteten 74 kDa, bzw. 106 kDa-Proteinen auch kleinere Proteinfragmente beobachtet, die mit den Antiseren reagieren. Diese kleineren Produkte gehen wahrscheinlich auf vorzeitige zurück.

Auf dem Fusionsprotein aus der Expression mit pMal EST befindet sich nur das Epitop für Serum B. Im Gegensatz dazu befinden sich auf dem Fusionsprotein von pMalA1 die Epitope der Seren B und C. Aus diesem Grunde erkennt das Antiserum C nicht das Expressionsprodukt von pMalEST und lediglich die größeren Proteinfragmente aus den Expressionversuchen mit pMalA1. Diese Beobachtung unterstreicht die hohe Spezifität der generierten Antiseren.

Beispiel 15

Um das Protein der katalytischen Telomerase-Untereinheit analysieren zu können, sollen die Proteinkomponente zusammen mit der RNA-Komponente *in vitro* rekonstituiert werden.

Die Konstrukte für diese Experimente sind im folgenden beschrieben:

Die 504 nt lange RNA Komponente (Feng *et al.*, 1995) wurde mit den Primern HTR9BAM (5'-

25 CGCGGATCCTAATACGACTCACTATAGGGTTGCGGAGGGTGGCCTG-3')

und HTR2BAM (5'-CGCGGATCCGGCGAGGGTGACGGATGC-3) aus einer

293 Zell-cDNA-Bibliothek amplifiziert. Der Primer HTR9BAM beinhaltet von

Nukleotid 10 bis 29 einen T7 Promotor. In der PCR wurden in einem Endvolumen

von 100 µl 3 µl cDNA aus 293-Zellen mit 10 pmol dNTP-Mix versetzt und in 1 x

30 PCR-Reaktionspuffer mit 0,5 µl Taq-Polymerase (Fa. Gibco) eine PCR-Reaktion

durchgeführt. Je 10 pmol der Primer HTR9BAM und HTR2BAM wurden zugefügt. Die PCR wurde in 3 Schritten durchgeführt. An eine zehnminütige Denaturierung bei 94°C schlossen sich 35 PCR-Zyklen an, in denen die DNA zunächst für eine Minute bei 94°C denaturiert wurde und anschließend für 2 min bei 62°C die Primer angelagert und die DNA-Kette verlängert wurde. Zum Abschluß folgte für 4 min eine Kettenverlängerung bei 72°C. Die entstandenen PCR-Produkte wurden nach einem Restriktionsverdau mit Bam HI in die Bam HI-Schnittstelle des Vektor pUC19 kloniert, so daß die RNA Komponente unter Kontrolle des T7-Promotors steht. Dieses Konstrukt wird im folgenden als HTR504 bezeichnet.

Das 3411 bp lange cDNA Fragment (Position 60 bis Position 3470, Fig. 1) wurde in den Vektor PCRII TOPO (Fa. Invitrogen) kloniert. Detailliertere Angaben zur Klonierung sind in Beispiel 8 und 7, bzw. in Fig. 12 beschrieben. In diesem als HTC FL bezeichneten Konstrukt liegt der T7 Promotor 5' vor der hTC cDNA.

Die Synthese der katalytischen Telomerase-Proteinkomponente erfolgte nach Zugabe des hTC FL-Konstrukt in einem kommerziell erhältlichen Transkriptions/Translation-System nach Angaben des Herstellers (Fa. Promega; Katalognummer L4610). Die erfolgreiche *in vitro* Translation des erwarteten 127 kDa Produktes wurde mittels ³⁵S-markiertem Cystein in einer SDS-PAGE (Ausubel *et al.*, 1987) kontrolliert (Fig. 17).

Die Synthese der Telomerase-RNA-Komponente erfolgte mit einem Transkriptions-System nach Angaben des Herstellers (Fa. Ambion; Katalognummer 1344) oder nach der von Pokrovskaya und Gurevich (1994) beschriebenen Methode.

Für die *in vitro* Rekonstitution wurden 50 µl des oben beschriebenen Translations-25 Ansatzes mit dem hTC FL-Konstrukt mit 0,5 µg hTRNA versetzt und 10 min bei 37°C inkubiert. 2 µl dieser Mischung wurden auf ihre enzymatische Aktivität mit Hilfe des TRAP-Assays untersucht (N.W. Kim *et al.*, 1994). Als Positivkontrolle diente eine Aktivitätsmessung nach gleicher Methode von aus HeLa-Zellen gereinigter Telomerase (Shay *et al.*, 1994). Wie in Fig. 18 zu sehen, erzeugen sowohl

das rekonstituierte Enzym als auch das native Enzym das gleiche Produktmuster, die für die Telomerase charakteristische Nukleotidleiter. Mit diesem Ergebnis wurde darüberhinaus belegt, daß eine einzige Proteinkomponente zusammen mit der RNA für die enzymatische Telomeraseaktivität ausreichend ist.

5 Zusätzlich zu dem beschriebenen TRAP-Assay wurden 5 µl der Rekonstitutionsmischung im direkten Telomerase-Assay (Shay *et al.*, 1994) auf ihre Aktivität geprüft. Auch in diesem Experiment belegt die charakteristische Nukleotidleiter die erfolgreiche Rekonstitution von rekombinantem hTC Protein und Telomerase-RNA-Komponente.

Zusammenfassend konnte hiermit auf funktioneller Ebene gezeigt werden, daß die identifizierte und vollständig klonierte hTC cDNA die katalytische Untereinheit der humanen Telomerase darstellt.

Literaturverzeichnis

Adams, M.D., Dubnick, M., Kerlavage, A.R., Moreno, R., Kelley, J.M., Utterback, T.R., Nagle, J.W., Fields, C. und Venter, J.C. (1992). Sequence identification of 2.375 human brain genes. 5 Nature 355: 632-634.

Allsopp, R. C., Vazire, H., Pattersson, C., Goldstein, S., Younglai, E.V., Futcher, A.B., Greider, C.W. und Harley, C.B. (1992). Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. 89, 10114-10118. 10

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. et al (1990). Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215, 403-410.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. 15 (1987). Current protocols in molecular biology. Greene Publishing Associates and Whiley-Intersciences, New York.

Blasco, M. A., Rizen, M., Greider, C. W. und Hanahan, D. (1996). Differential regulation of telomerase activity and telomerase RNA during multistage tumorigenesis. Nature Genetics 12, 200-204. 20

Broccoli, D., Young, J. W. und deLange, T. (1995). Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. 92, 9082-9086.

Collins, K., Kobayashi, R. und Greider, C. W. (1995). Purification of Tetrahymena telomerase and cloning of genes encoding the two protein components of the enzyme. Cell 81, 677-686.

Counter, C. M., Avilion, A. A., LeFeuvre, C. E., Stewart, N. G. Greider, C.W. Harley, C. B. und Bacchetti S. (1992). Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in 30 immortal cells which express telomerase activity. EMBO J. 11, 1921-1929.

Counter, C. M., Gupta, J., Harley, C. B., Leber, B. und Bacchetti, S. (1995). Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies. Blood 85, 2315-2320.

35 Feng, J., Funk, W. D., Wang, S.-S., Weinrich, S. L., Avilion, A.A., Chiu, C.-P., Adams, R.R., Chang, E., Allsopp, R.C., Yu, J., Le, S., West, M.D., Harley, C.B., Andrews, W.H., Greider,

C.W. und Villeponteau, B. (1995). The RNA component of human telomerase. *Science* 269, 1236-1241.

5 Gerhold, D. und Caskey, T. (1996). It's the genes! EST access to human genome content. *BioEssays* 18, 973-981.

Goldstein, S. (1990). Replicative senescence: The human fibroblast comes of age. *Science* 249, 1129-1133.

10 Greider, C. W. und Blackburn, E. H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 43, 405-413.

Greider, C. W. und Blackburn, E. H. (1987). The telomere terminal transferase of *Tetrahymena* is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell* 51, 887-898.

15 Greider, C. W. und Blackburn, E. H. (1989). A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* 337, 331-337.

20 Harley, C. B., Futcher, A. B. und Greider, C. W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345, 458-460.

Harrington, L., McPhail, T., Mar, V., Zhou, W., Oulton, R., Amgen EST Program, Bass, M.B., Arruda, I. und Robinson, M.O. (1997). A mammalian telomerase-associated protein. *Science* 275: 973-977.

25 Hastie, N. D., Dempster, M., Dunlop, M. G., Thompson, A. M., Green, D.K. und Allshire, R.C. (1990). Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* 346, 866-868.

30 Hiyama, K., Hirai, Y., Kyoizumi, S., Akiyama, M., Hiyama, E., Piatyszek, M.A., Shay, J.W., Ishioka, S. und Yamakido, M. (1995). Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. *J. Immunol.* 155, 3711-3715.

35 Kim, N.W., Piatyszek, M.A., Prowse, K.R., Harley, C. B., West, M.D., Ho, P.L.C., Coviello, G.M., Wright, W.E., Weinrich, S.L. und Shay, J.W. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266, 2011-2015.

Lingner, J., Hughes, T.R., Shevchenko, A., Mann, M., Lundblad, V. und Cech T.R. (1997). Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science* 276: 561-567.

5 Lundblad, V. und Szostak, J. W. (1989). A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. *Cell* 57, 633-643.

McClintock, B. (1941). The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics* 26, 234-282.

10 Meyne, J., Ratliff, R. L. und Moyzis, R. K. (1989). Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 7049-7053.

15 Okubo, K., Hori, N., Matoba, R., Niiyama, T., Fukushima, A., Kojima, Y. and Matsubara, K. (1992). Large scale cDNA sequencing for analysis of quantitative and qualitative aspects of gene expression. *Nature Genetics* 2: 173-179.

20 Olovnikov, A. M. (1973). A theory of marginotomy. *J. Theor. Biol.* 41, 181-190.

Poch, O., Sauvaget, I., Delarue, M. und Tordo, N. (1989). Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO J.* 8: 3867-3874.

25 Pokrovskaya, I.D. and Gurevich, V.V. (1994). *In vitro* transcription: Preparative RNA yields in analytical scale reactions. *Analytical Biochemistry* 220, 420-423.

Prowse, K. R., Avilion, A. A. und Greider, C. W. (1993). Identification of a nonprocessive telomerase activity from mouse cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 1493-1497.

30 Sandell, L. L. und Zakian, V. A. (1993). Loss of a yeast telomere: Arrest, recovery and chromosome loss. *Cell* 75, 729-739.

Shampay, J. und Blackburn, E. H. (1988). Generation of telomere-length heterogeneity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 534-538.

35 Shay, J. W., Brasiskyte, D., Ouellette, M., Piatyszek, M.A., Werbin, H., Ying, Y. and Wright, E.W. (1994). Analysis of telomerase and telomeres. *Methods of Molecular Genetics* 5, 263-280.

Shay, J. W. (1997). Telomerase and Cancer. Ciba Foundation Meeting: Telomeres and Telomerase. London.

5 Singer, M. S. und Gottschling, D. E. (1994). *TLC1*: Template RNA Component of *Saccharomyces cerevisiae* Telomerase. *Science* 266, 404-409.

Vaziri, H., Dragowska, W., Allsopp, R. C., Thomas, T. E., Harley, C.B. und Landsdorf, P.M. (1994). Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: Loss of telomeric DNA with age. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 9857-9860.

10

Xiong, Y. und Eickbush, T.H. (1990). Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences. *EMBO J.* 9: 3353-3362.

15

Yu, G.-L., Bradley, J. D., Attardi, L. D. und Blackburn, E. H. (1990). *In vivo* alteration of telomere sequences and senescence caused by mutated *Tetrahymena* telomerase RNAs. *Nature* 344, 126-132.

Zakian, V. A. (1995). Telomeres: Beginning to understand the end. *Science* 270, 1601-1607.

Patentansprüche

1. Katalytisch aktive humane Telomerase-Untereinheit, ihre funktionellen Äquivalente, ihre Varianten und ihre katalytisch aktiven Fragmente.
- 5 2. Telomerase gemäß Anspruch 1, enthaltend die Aminosäuresequenz gemäß Abb. 2 oder deren funktionelle Äquivalente.
- 10 3. Nucleinsäuresequenzen codierend für Verbindungen gemäß den Ansprüchen 1 und 2 und ihre funktionellen Äquivalente.
4. Nucleinsäuresequenzen gemäß Anspruch 3, enthaltend die DNA-Sequenz aus Abb. 1 oder ihre funktionellen Äquivalente.
- 15 5. Antisense Nucleinsäuren bindend an die DNA gemäß Anspruch 3 oder 4.
6. Antikörper gegen Telomerase gemäß den Ansprüchen 1 und 2, gegebenenfalls markiert mit einem oder mehreren Markern.
- 20 7. Verwendung von Nucleinsäuresequenzen gemäß den Ansprüchen 3 und 4 zur Herstellung von Telomerase.
8. Verwendung von Antikörpern gemäß Anspruch 6 zur Diagnose.
- 25 9. Verwendung von Antikörpern gemäß Anspruch 6 zur Herstellung von Arzneimitteln.
10. Vektor enthaltend die DNA gemäß Anspruch 3 und 4.
- 30 11. Mikroorganismen enthaltend den Vektor gemäß Anspruch 10.

12. Screening Assay zur Auffindung von Modulatoren der humanen Telomerase enthaltend die Telomerase gemäß den Ansprüchen 1 und 2.
13. Verfahren zur Herstellung der Telomerase gemäß den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß man den Mikroorganismus gemäß Anspruch 11 kultiviert und die Telomerase isoliert.

Humane katalytische Telomerase-Untereinheit und deren diagnostische und therapeutische Verwendung

Z u s a m m e n f a s s u n g

Diese Erfindung betrifft die Nukleotidsequenz und die davon abgeleitete Proteinsequenz, die für die humane katalytische Telomerase-Untereinheit codiert. Darüberhinaus betrifft diese Erfindung Methoden, die eine pharmazeutische, diagnostische oder therapeutische Verwendung von diesem Gen/Protein beinhaltet, vor allem in der Behandlung von Krebs und Alterung.

Fig. 1

GTTTCAGGCA GCGCTGCGTC CTGCTGCGCA CGTGGGAAGC CCTGGCCCCG GCCACCCCCG CGATGCCGCG 70
 CGCTCCCCGC TGCCGAGCCG TGCGCTCCCT GCTGCGCAGC CACTACCGCG AGGTGCTGCC GCTGGCCACG 140
 TTCGTGCGGC GCCTGGGGCC CCAGGGCTGG CGGCTGGTGC AGCGCGGGGA CCCGGCGGCT TTCCGCGCGC 210
 TGGTGGCCCA GTGCTGGTG TGCGTGCCT GGGACGCACG GCCGCCCCCC GCCGCCCCCT CCTTCCGCCA 280
 GGTGTCTGC CTGAAGGAGC TGGTGGCCCG AGTGCTGCAG AGGCTGTGCG AGCGCGGCAG GAAGAACGTG 350
 CTGGCCTTCG GCTTCGCGCT GCTGGACGGG GCCCCGGGG GCCCCCCGA GCCCTTCACC ACCAGCGTGC 420
 GCAGCTACCT GCCAACACAG GTGACCGACG CACTGCGGGG GAGCGGGGCG TGGGGGCTGC TGCTGCCCG 490
 CGTGGCGAC GACGTGCTGG TTCACCTGCT GGCACGCTGC GCGCTCTTG TGCTGGTGGC TCCCAGCTGC 560
 GCCTACCAGG TGTGCGGGCC GCCGCTGTAC CAGCTCGGCG CTGCCACTCA GGGCCGGCCC CGGCCACACG 630
 CTAGTGGACC CCGAAGGCGT CTGGGATGCG AACGGGCTG GAACCATAGC GTCAAGGGAGG CGGGGGTCCC 700
 CCTGGGCCTG CCAGCCCCGG GTGCGAGGAG GCGCGGGGGC AGTGCCAGCC GAAGTCTGCC GTTGCCAAG 770
 AGGCCAGGC GTGGCGCTGC CCCTGAGCCG GAGCGACGC CGGTGGGCA GGGGTCTGG GCCCCACCCGG 840
 GCAGGACGCG TGGACCGAGT GACC GTGGTT TCTGTGTGGT GTCACCTGCC AGACCCGCCG AAGAACGCCAC 910
 CTCTTGGAG GGTGCGCTCT CTGGCACGCG CCACCTCCAC CCATCCGTGG GCGCCAGCA CCACGCGGGC 980
 CCCCCATCCA CATCGCGGCC ACCACGTCCC TGGGACACGC CTTGTCCCCC GGTGTACGCC GAGACCAAGC 1050
 ACTTCCTCTA CTCCTCAGGC GACAAGGAGC AGCTGCGGCC CTCTTCCCTA CTCAGCTCTC TGAGGCCCAG 1120
 CCTGACTGGC GCTCGGAGGC TCGTGGAGAC CATCTTCTG GGTTCAGGC CCTGGATGCC AGGGACTCCC 1190
 CGCAGGTTGC CCCGCCTGCG CCAGCGCTAC TGGCAAATGC GGCCCCGTGG TCTGGAGCTG CTTGGGAACC 1260
 CGCGCAGTG CCCCTACGGG GTGCTCTCA AGACGCACTG CCCGCTGCCA GCTGCCGTCA CCCCAGCAGC 1330
 GTGTCTGT GCCCCGGAGA AGCCCCAGGG CTCTGTGGCG GCCCCCGAGG AGGAGGACAC AGACCCCGT 1400
 CCTGGTGC AGCTGCTCCG CCAGCACAGC AGCCCCCTGGC AGGTGTACGG CTTCGTGCCG GCCTGCCCTGC 1470
 GCCGGCTGGT GCCCCCAGGC CTCTGGGCT CCAGGCACAA CGAACGCCGC TTCTCAGGA ACACCAAGAA 1540
 GTTCATCTCC CTGGGGAAGC ATGCCAAGCT CTCGCTGCAG GAGCTGACGT GGAAGATGAG CGTGCAGGGAC 1610
 TCGCCTTGGC TCGCAGGAG CCCAGGGGTT GGCTGTGTT CGGCCGCAGA GCACCGTCTG CGTGAGGAGA 1680
 TCCTGGCAA GTTCCTGCAC TGGCTGATGA GTGTGTACGT CGTCGAGCTG CTCAGGTCTT TCTTTATGT 1750
 CACGGAGACC ACGTTCAAA AGAACAGGCT CTTTTCTAC CGGAAGAGTG TCTGGAGCAA GTTGCAAAAGC 1820
 ATTGGAATCA GACAGCACTT GAAGAGGGTG CAGCTGCCGG AGCTGTCGGA AGCAGAGGTC AGGCAGCAGTC 1890
 GCGAAGCCAG GCCCCCCTG CTGACGTCCA GACTCCGCTT CATCCCCAAG CCTGACGGGC TGCGGCCGAT 1960
 TGTGAACATG GACTACGTCG TGGGAGCCAG AACGTTCCGC AGAGAAAAGA GGGCCGAGCG TCTCACCTCG 2030
 AGGGTGAAGG CACTGTTCAAG CGTGTCAAC TACGAGCCGG CGCCGCCCTG GGCGCCTCTG 2100
 TGCTGGCCT GGACGATATC CACAGGGCCT GGCGCACCTT CGTGTGCGT GTGCGGGCCC AGGACCCGCC 2170
 GCCTGAGCTG TACTTTGTCA AGGTGGATGT GACGGCGCG TACGACACCA TCCCCCAGGA CAGGCTCACG 2240
 GAGGTCACTCG CCAGCATCAT CAAACCCCAG AACACGTACT GCGTGCCTCG GTATGCCGTG GTCCAGAAGG 2310
 CCGCCCATGG GCACGTCCGC AAGGCCTTCA AGAGCCACGT CTCTACCTTG ACAGACCTCC AGCCGTACAT 2380
 CGGACAGTTC GTGGCTCACC TGCGAGAGAC CAGCCCGCTG AGGGATGCCG TCGTCATCGA GCAGAGCTCC 2450
 TCCCTGAATG AGGCCAGCAG TGGCCTCTTC GACGTCTTC TACGCTTCAT GTGCCACCA CGCGTGCAGCA 2520
 TCAGGGGCAA GTCTTACGTC CAGTGCCAGG GGATCCCGCA GGGCTCCATC CTCTCCACGC TGCTCTGCAG 2590
 CCTGTGCTAC GGCGACATGG AGAACAAAGCT GTTGCGGGG ATTCCGGGGG ACGGGCTGCT CCTGCCTTG 2660
 GTGGATGATT TCTTGTGGT GACACCTCAC CTCACCCACG CGAAAACCTT CCTCAGGACC CTGGTCCGAG 2730
 GTGTCCCTGA GTATGGCTGC GTGGTGAAC TGCGGAAGAC AGTGGTGAAC TTCCCTGTAG AAGACGAGGC 2800
 GTGGGTGGC ACGGCTTTG TTCAGATGCC GGCCCACGGC CTATTCCCT GGTGCCTGCC GCTGCTGGAT 2870
 CCCGGACCC TGGAGGTGCA GAGCGACTAC TCCAGCTATG CCCGGACCTC CATCAGAGCC AGTCTCACCT 2940
 TCAACCGCGG CTTCAAGGCT GGGAGGAACA TCGTGCAGCA ACTCTTGGG GTCTTGCCTGC TGAAGTGTCA 3010
 CAGCCTGTT CTGGATTTGC AGGTGAACAG CCTCCAGACG GTGTGCACCA ACATCTACAA GATCCTCCTG 3080
 CTGCAGGCGT ACAGGTTCA CGCATGTGTG CTGCAGCTCC CATTTCATCA GCAAGTTGG AGAACCCCA 3150
 CATTTCCTCG GCGCGTCATC TCTGACACGG CCTCCCTCTG CTACTCCATC CTGAAAGCCA AGAACGCAGG 3220
 GATGTGCTG GGGCCAAGG GCGCCGCCGG CCCTCTGCC TCCGAGGCCG TGCAGTGGCT GTGCCACCAA 3290
 GCATTCCCTGC TCAAGCTGAC TCGACACCGT GTCACCTACG TGCCACTCCT GGGGTCACTC AGGACAGCCC 3360
 AGACGCAGCT GAGTCGGAAG CTCCCCGGGA CGACGCTGAC TGCCCTGGAG GCCGCAGCCA ACCCGGCACT 3430
 GCCCTCAGAC TTCAAGACCA TCCTGGACTG ATGGCCACCC GCCCACAGCC AGGCCGAGAG CAGACACCAAG 3500
 CAGCCCTGTC ACGCCGGGCT CTACGTCCC GGGAGGGAGG GGCGGCCAC ACCCAGGCC GCACCGCTGG 3570
 GAGTCTGAGG CCTGAGTGAG TGTGGCCCG AGGCCTGCAT GTCCGGCTGA AGGCTGAGTG TCCGGCTGAG 3640
 GCCTGAGCGA GTGTCCAGCC AAGGGCTGAG GTGTCCAGCAC ACCTGCCGTC TTCACCTCCC CACAGGCTGG 3710
 CGCTCGGCTC CACCCAGGG CCAGCTTTTC CTACCGAGA GCCCGGCTTC CACTCCCCAC ATAGGAATAG 3780
 TCCATCCCCA GATTGCCAT TGTTCACCCC TCGCCCTGCC CTCTTGCCT TTCCACCCCC ACCATCCAGG 3850
 TGGAGACCCCT GAGAAGGACC CTGGGAGCTC TGGGATTG GAGTGAACAA AGGTGTGCCG TGTACACAGG 3920
 CGAGGACCCCT GCACCTGGAT GGGGTCCCT GTGGTCAAAT TTGGGGGAG GTGCTGTGG AGTAAAATAC 3990
 TGAATATATG AGTTTTCAAG TTTTGAAGAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AA 4042

Fig. 2

MPRAPRCRAV RSLLRSHYRE VLPLATFVRR LGPQGWRLVQ RGDPAAFRAL	50
VAQCLVCVPW DARPPPAAPS FRQVSCLKEL VARVLQRLCE RGAKNVLAFG	100
FALLDGARGG PPEAFTTSVR SYLPNTVTDA LRGSGAWGLL LRRVGDDVLV	150
HLLARCALFV LVAPSCAYQV CGPPLYQLGA ATQARPPPNA SGPRRLGCE	200
RAWNHHSVREA GVPGLPAPG ARRGGSASR SLPLPKRPRR GAAPEPERTP	250
VGQGWSWAHPG RTRGSPSDRGF CVVSPARPAE EATSLEGALS GTRHSHPSVG	300
RQHHAGPPST SRPPRPWDTP CPPVYAETKH FLYSSGDKEQ LRPSFLLSSL	350
RPSLTGARRL VETIFLGSRP WMPGTPRRLP RLPQRYWQMR PLFLELLGNH	400
AQCPYGVLLK THCPLRAAVT PAAGVCAREK PQGSVAAPEE EDTDPRLVQ	450
LLRQHSSPWQ VYGFVRACLR RLVPPGLWGS RHNERFLRN TKKFISLGKH	500
AKLSLQELTW KMSVRDCAWL RRSPGVGCVP AAEHRLREEI LAKFLHWLMS	550
VYVVELLRSF FYVTETTFQK NRLFFYRKSV WSKLQSIGIR QHLKRVQLRE	600
LSEAEVRQHR EARPALLSR LRFIPKPDGL RPIVNMDYVV GARTFRREKR	650
RLTSRVKA LFSVLYNTERA RRPGLLGASV LGLDDIHRAW RTFVLRVRAQ	700
PPELYFVK VDVTGAYDTI PQDRLTEVIA SIIKPQNTYC VRYYAVVQKA	750
AHGHRKAFK SHVSTLTDLQ PYMRQFVAHL QETSPRLDAV VIEQSSSLNE	800
ASSGLFDVFL RFMCHHAVRI RGKSYVQCQG IPQGSILSTL LCSLCYGDME	850
NKLFAGIRR D GLLLRLVDDF LLVTPLHLTA KTFLRTLVRG VPEYGCVNL	900
RKTVVNFPEV DEALGGTAFV QMPAHGLFPW CGLLLDTRTL EVQSDYSSYA	950
RTSIRASLT NRGFKAGRNM RRKLFGVRL KCHSLFLDLQ VNSLQTVCTN	1000
IYKILLLQAY RFHACVLQLP FHQQWKNPT FFLRVISDTA SLCYSILKAK	1050
NAGMSLGAKG AAGPLPSEAV QWLCHQAFLL KLTRHRVTYV PLLGSLRTAQ	1100
TQLSRKLPGT TLTAAEAAAN PALPSDFKTI LD	1132

Le A 32 486-DE-02

Fig. 3

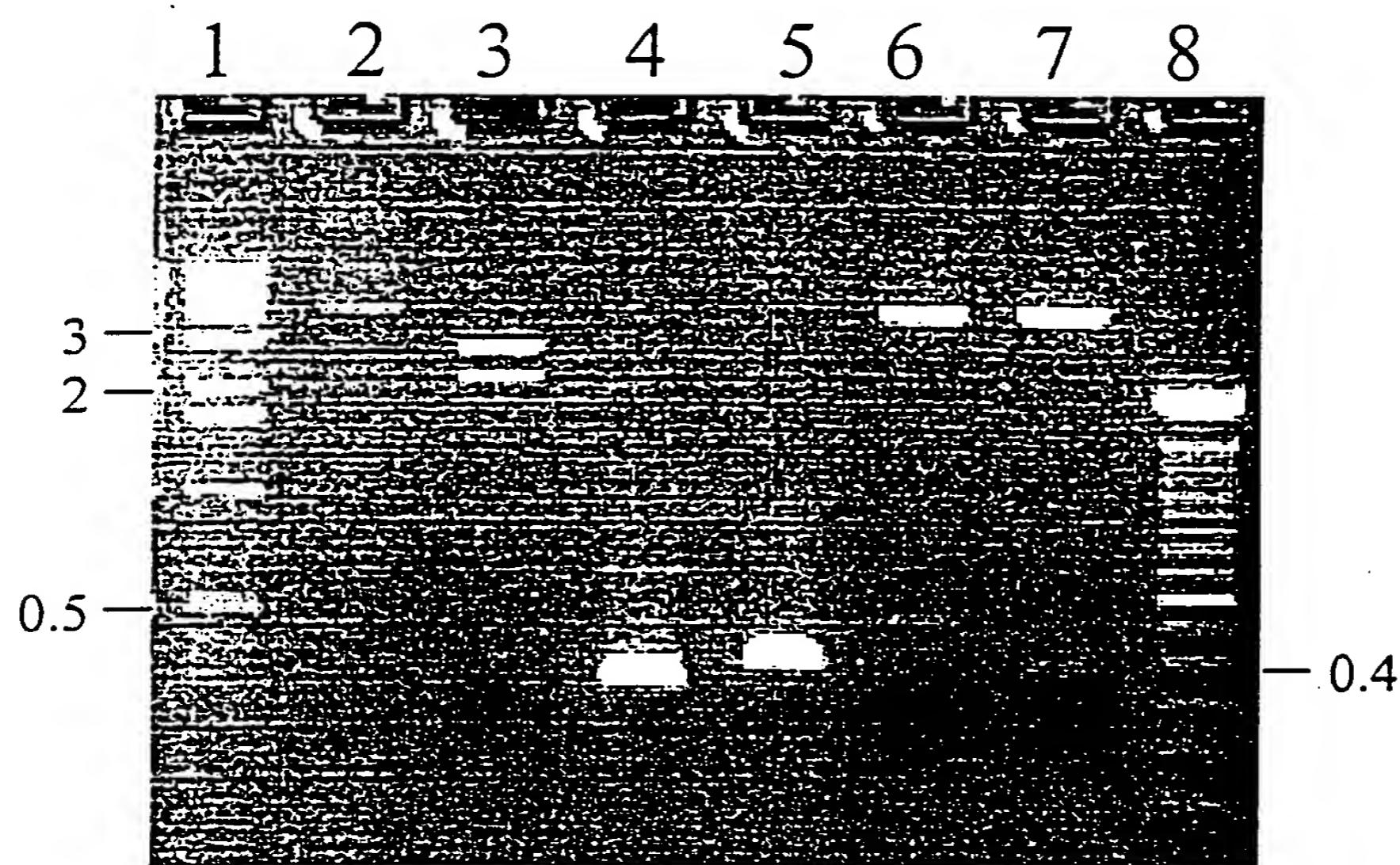


Fig. 4

Fig. 6

Lipman-Pearson Protein Alignment

Ktuple: 2; Gap Penalty: 4; Gap Length Penalty: 12

Seq1(1>129)	Similarity	Gap	Gap	Consensus
EST2P.PRO	Index	Number	Length	Length
(1>80)	23.3	3	3	83
PHTC.PRO	FLHWLMSVYVVELLRSFFYVTTTFFOKNIRLFFYRKSYW	30	30	70
EST2P.PRO	EST2P.PRO	10	10	10
PHTC.PRO	FLHWLMSVYVVELLRSFFYVTTTFFOKNIRLFFYRKSYW	30	30	70
EST2P.PRO	EST2P.PRO	10	10	10
PHTC.PRO	IPKPDGLRPIVNMDYVVGARTFRREREKRAERLTSRVK	90	100	110
EST2P.PRO	EST2P.PRO	80	90	100
PHTC.PRO	IPKIPKSNNEFRIIIAIPCRGADEEEFTIYKENHKNAI	120	120	120

Fig. 7

Alignment Workspace of Untitled, using Clustal method with PAM250 residue weight table.

Fig. 8

GTGCCTGCAG AGACCCGTCT GGTGCACTCT GATTCTCCAC TTGCCTGTTG CATGTCCCTCG TTCCCTTGT	70
TCTCACCACC TCTTGGGTTG CCATGTGCGT TTCCCTGCCGA GTGTGTGTTG ATCCTCTCGT TGCCTCCCTGG	140
TCACTGGGCA TTTGCTTTA TTTCTCTTGT CTTAGTGTAA CCCCCCTGATC TTTTTATTTGT CGTTGTTTGC	210
TTTTGTTAT TGAGACAGTC TCACCTGTGTC ACCCAGGCTG GAGTGTAAATG GCACAATCTC GGCTCACTGC	280
AACCTCTGCC TCCTCGGTTA AAGCAGTTCT CATTCTCAA CCTCATGAGT AGCTGGGATT ACAGGCGCCC	350
ACCACCAACGC CTGGCTAATT TTTGTATTT TAGTAGAGAT AGGCTTCAC CATGTTGGCC AGGCTGGTCT	420
CAAACCTCTG ACCTCAAGTG ATCTGCCCGC CTTGGCCTCC CACAGTGCTG GGATTACAGG TGCAAGCCAC	490
CGTGCCCGGC ATACCTTGAT CTTTTAAAT GAAGTCTGAA ACATTGCTAC CCTTGTCCCTG AGCAATAAGA	560
CCCTTAGTGT ATTTAGCTC TGCCACCCCC CCAGCCTGTG TGCTGTTTC CCTGCTGACT TAGTTCTATC	630
TCAGGCATCT TGACACCCCC ACAAGCTAAG CATTATTAAT ATTGTTTCC GTGTTGAGTG TTTCTTTAGC	700
TTTGCCCCCG CCCTGCTTT CCTCCTTGT TCCCCGTCTG TCTTCTGTCT CAGGCCCGCC GTCTGGGTC	770
CCCTTCCTTG TCCTTTCGCT GGGTCTTCTG TCTTGTATT GCTGGTAAAC CCCAGCTTA CCTGTGCTGG	840
CCTCCATGGC ATCTAGCGAC GTCCGGGGAC CTCTGCTTAT GATGCACAGA TGAAGATGTG GAGACTCACG	910
AGGAGGGCGG TCATCTTGGC CCGTGAGTGT CTGGAGCACC ACGTGGCCAG CGTTCCCTTAG CCAGGGTTGG	980
CTGTGTTCCG GCCGCAGAGC ACCGTCTGCG TGAGGAGATC CTGGCCAAGT TCCTGCAC TG GCTGATGAGT	1050
GTGTACGTG TCGAGCTGCT CAGGTCTTTC TTTTATGTCA CGGAGACAC GTTTCAAAAG AACAGGCTCT	1120
TTTCTACCG GAAGAGTGTG TGGAGCAAGT TGC	1153

Fig. 9

CAGAGCCCTG	GTCCTCCTGT	CTCCATCGTC	ACGTGGGCAC	ACGTGGCTTT	TCGCTCAGGA	CGTCGAGTGG	70
ACACGGTGAT	CTCTGCCTCT	GCTCTCCCTC	CTGTCCAGTT	TGCATAAACT	TACGAGGTTC	ACCTTCACGT	140
TTTGATGGAC	ACGGCGTTTC	CAGGCACCGA	GGCCAGAGCA	GTGAACAGAG	GAGGCTGGGC	GCAGGCACTGG	210
AGCCGGGTTG	CCGGCAATGG	GGAGAAGTGT	CTGGAAGCAC	AGACGCTCTG	GCGAGGGTGC	CTGCAGAGAC	280
CCGCCTGGTG	CACTCTGATT	CTCCACTTGC	CTGTTGCATG	TCCTCGTTCC	CTTGTTCCTC	ACCACCTCTT	350
GGGTTGCCAT	GTGCGTTTCC	TGCCGAGTGT	GTGTTGATCC	TCTCGTTGCC	TCCTGGTCAC	TG	412

Fig. 10

GGGGTCTGG	GCCCACCCGG	GCAGGACGCG	TGGACCGAGT	GACCGTGGTT	TCTGTGTGGT	GTCACCTGCC	70
AGACCCGCCG	AAGAAGCCAC	CTCTTTGGAG	GGTGCCTCT	CTGGCACGCG	CCACTCCCAC	CCATCCGTGG	140
GCCGCCAGCA	CCACGCGGGC	CCCCCATCCA	CATCGCGGCC	ACCACGTCCC	TGGGACACGC	CTTGTCCCC	210
GGTGTACGCC	GAGACCAAGC	ACTTCCTCTA	CTCCTCAGGC	GACAAGGAGC	AGCTGCGGcC	CTCCCTCCTA	280
CTCAGCTCTC	TGAGGCCAG	CCTGACTGGC	GCTCGGAGGC	TCGTGGAGAC	CATCTTCTG	GGTTCCAGGC	350
CCTGGATGCC	AGGGACTCCC	CGCAGGTTGC	CCCGCCTGCC	CCAGCGCTAC	TGGCAAATGC	GGCCCCCTGTT	420
TCTGGAGCTG	CTTGGGAACC	ACGCGCAGTG	CCCCTACGGG	GTGCTCCTCA	AGACGCACTG	CCCGCTGCGA	490
GCTGCGGTCA	CCCCAGCAGC	CGGTGTCTGT	GCCCCGGAGA	AGCCCCAGGG	CTCTGTGGCG	GCCCCCGAGG	560
AGGAGGACAC	AGACCCCCGT	CGCCTGGTGC	AGCTGCTCCG	CCAGCACAGC	AGCCCCCTGGC	AGGTGTACGG	630
CTTCGTGCGG	GCCTGCTGC	GCCGGCTGGT	GCCCCCAGGC	CTCTGGGCT	CCAGGCACAA	CGAACGCCGC	700
TTCCTCAGGA	ACACCAAGAA	GTTCATCTCC	CTGGGGAAGC	ATGCCAAGCT	CTCGCTGCAG	GAGCTGACGT	770
GGAAAGATGAG	CGTGCGGGAC	TGCGCTTGGC	TGCGCAGGAG	CCCAGGTGAG	GAGGTGGTGG	CCGTCGAGGG	840
CCCAGGCCCC	AGAGCTGAAT	GCAGTAGGGG	CTCAGAAAAG	GGGGCAGGCA	GAGCCCTGGT	CCTCCTGTCT	910
CCATCGTCAC	GTGGGCACAC	GTGGCTTTTC	GTCAGGACG	TCGAGTGGAC	ACGGTGATCT	CTGCCTCTGC	980
TCTCCCTCCT	GTCCAGTTG	CATAAACTTA	CG				1012

Fig. 11

GAATTCTCGGG CCGCGTCGAC GTTTCAGGCA GCGCTGCGTC CTGCTGCGCA CGTGGGAAGC CCTGGCCCCG 70
 GCCACCCCCG CGATGCCGCG CGCTCCCCGC TGCGAGCCG TGCGCTCCCT GCTGCGCAGC CACTACCGCG 140
 AGGTGCTGCC GCTGGCCACG TTCTGCGGC GCCTGGGCC CCAGGGCTGG CGGCTGGTGC AGCGCGGGGA 210
 CCCGGCGGCT TTCCGCGCGC TGGTGGCCA GTGCCTGGTG TGCGTGCCT GGGACGCACG GCCGCCCCCC 280
 GCCGCCCCCT CTTCCGCCA GGTGTCTGC CTGAAGGAGC TGGTGGCCG AGTGTGCAAG AGGCTGTGCG 350
 AGCGCGGCGC GAAGAACGTG CTGGCCTCG GCTTCGCGCT GCTGGACGGG GCCCGCGGGG GCCCCCCCGA 420
 GGCCTTCACC ACCAGCGTGC GCAGCTACCT GCCAACACG GTGACCGACG CACTGCGGGG GAGCGGGCG 490
 TGGGGCTGC TGCTGCGCCG CGTGGCGAC GACGTGCTGG TTCACCTGCT GGACGCTGC GCGCTCTTG 560
 TGCTGGTGGC TCCCAGCTGC GCCTACCAAG TGTGCGGGCC GCCGCTGTAC CAGCTCGCGC CTGCCACTCA 630
 GGCCCCGGCCC CCGCCACACG CTAGTGGACC CCGAAGGCCT GTGGGATGCG AACGGGCCTG GAACCATAGC 700
 GTCAGGGAGG CCGGGGTCCC CCTGGGCTG CCAGCCCCGG GTGCGAGGAG GCGCGGGGGC AGTGCAGGCC 770
 GAAGTCTGCC GTTGCCCAAG AGGCCCAAGG GTGGCGCTGC CCCTGAGCCG GAGCGGACGC CCGTTGGCA 840
 GGGGTCTGG GCCCACCCGG GCAGGACGCG TGGACCGAGT GACCGTGGTT TCTGTGTGGT GTCACCTGCC 910
 AGACCCGCCG AAGAACCCAC CTCTTGGAG GGTGCGCTCT CTGGCACCGC CCACTCCAC CCATCCGTGG 980
 GCCGCCAGCA CCACGCGGGC CCCCCATCCA CATCGCGGCC ACCACGTCCC TGGGACACGC CTTGTCCCC 1050
 GGTGTACGCC GAGACCAAGC ACTTCCTCTA CTCCCTCAGGC GACAAGGAGC AGCTGCGGCC CTCCCTCCTA 1120
 CTCAGCTCTC TGAGGCCAG CCTGACTGGC GTCGGAGGC TCGTGGAGAC CATCTTCTG GGTTCAGGC 1190
 TGGATGCC AGGGACTCCC CGCAGGTTGC CCCGCCTGCC CCAGCGCTAC TGGCAAATGC GGGCCCTGTT 1260
 GGAGCTG CTTGGGAACC ACGCGCAGTG CCCCTACGGG GTGCTCCTCA AGACGCACTG CCCGCTGCCA 1330
 GCGGTCA CCCCCAGCAGC CGGTGTCTGT GCCCGGGAGA AGCCCCAGGG CTCTGTGGCG GCCCCCGAGG 1400
 AGGAGGACAC AGACCCCCGT CGCCTGGTGC AGCTGCTCCG CCAGCACAGC AGCCCCCTGGC AGGTGTACGG 1470
 CTTCGTGCCG GCCTGCCTGC GCCGGCTGGT GCCCCCCAGGC CTCTGGGCT CCAGGCACAA CGAACGCCGC 1540
 TTCCCTCAGGA ACACCAAGAA GTTCATCTCC CTGGGAAAGC ATGCCAAGCT CTCGCTGCAG GAGCTGACGT 1610
 GGAAGATGAG CGTGCAGGAC TGCGCTTGGC TGCGCAGGAG CCCAGGTGAG GAGGTGGTGG CCGTCGAGGG 1680
 CCCAGGCCCG AGAGCTGAAT GCAGTAGGGG CTCAGAAAAG GGGGCAGGCA GAGCCCTGGT CCTCCTGTCT 1750
 CCATCGTCAC GTGGCACAC GTGGCTTTG GTCAGGACG TCGAGTGGAC ACGGTGATCT CTGCCTCTGC 1820
 TCTCCCTCCT GTCCAGTTG CATAAACTTA CGAGGTTCAC TTTCACGTT TGATGGACAC GGGGTTCCA 1890
 GGCAGCGAGG CCAGAGCAGT GAACAGAGGA GGCTGGCGC GGCAGTGGAG CCGGGTTGCC GGCAATGGGG 1960
 AGAAGTGTCT GGAAGCACAG ACGCTCTGGC GAGGGTGCCT GCAGGGTTG GCTGTGTTCC GGCAGCAGAG 2030
 CACCGTCTGC GTGAGGAGAT CCTGGCCAAG TTCCCTGCACT GGCTGATGAG TGTGTACGTC GTCAGCTGC 2100
 TCAGGTCTT CTTTATGTC ACGGAGACCA CGTTTCAAAA GAACAGGCTC TTTTCTACC GGAAGAGTGT 2170
 CTGGAGCAAG TTGCAAAGCA TTGGAATCAG ACAGCACTTG AAGAGGGTGC AGCTGCGGGG GCTGTCGGAA 2240
 GCAGAGGTCA GGCAGCATCG GGAAGCCAGG CCCGCCCTGC TGACGTCCAG ACTCCGCTTC ATCCCCAAGC 2310
 CTGACGGGCT GCGGCCGATT GTGAACATGG ACTACGTCTG GGGAGCCAGA ACGTTCCGCA GAGAAAAGAG 2380
 GGTGGCTGTG CTTGGTTTA ACTTCCTTT TAAACAGAAG TGCGTTGAG CCCCACATTG GGTATCAGCT 2450
 TAGATGAAGG GCGGGAGGA GGGGCCACGG GACACAGCCA GGGCCATGGC ACGGCGCCAA CCCATTGTTG 2520
 CGCACGGTGA GGTGGCCGAG GTGCCGGTGC CTCCAGAAAA GCAGCGTGGG GGTGTAGGGG GAGCTCCTGG 2590
 GGCAGGGACA GGCTCTGAGG ACCACAAGAA GCAGCTGGC CAGGGCCTGG ATGCAGCACG GCCCGAGCGG 2660
 TGGGGGCC ACCACCCAT TCTGGTCAAAG GGTGTTGAG TCGTAATAGC CGGCCAGGC GCTCTGAACC 2730
 CAGAGTCT CAAAAGCTGG GACCCTCAGG GCCAAATGGG GCCACACCTT GTCCTGGAAG AAATCATGGT 2800
 ACTTCCAG GTTCGCCGGG TCCGGTTCTT CCTGCTCAGT GGGGCTACGA CCACCTAGGT AGTTGCTACC 2870
 TAATCCTTCC CGGGAAAAT AGGCTCCACT GGTGTCTGCA ACAAGCGGAG TCTCTAGGCC TGTCCTGG 2940
 GGGCAGTGCC ACACATACAC ATACCTTTTC CTCGGCTCCA CAGGTAGCTT GGTGCCCTGC AGGGTGCCAG 3010
 GCGGCCCTC TCCAACACCA GCCAGTGCTG CGATTGCGC AGACCAGGCT CCGGCTGCCTG TGATCACAAT 3080
 GCGCATTCC ACAGGGCTGGT ACTCCAGGCT GCGGTCCATC TTCACATGGA CTTCATGGAT CTTTTCAAG 3150
 ACCACCGCTT TGTCAATCTG GGTCAACATG CGTTGAGATG AAGAGACAAA ACGTGTCAAC TCTCCCTGGC 3220
 AGAAAAGGAC TCCCAAGGAC TGGACCTTC GCCGAAGCCC CTGGAGCAGA CACCAGGGT CAAACCAACC 3290
 TTCTGCTCTCC ATCCCCATAAG ACGCCAAAGC CACTCCCTCT GTGTTTATCC AGGGAAACTT GTTCCGAAGC 3360
 TGATCAGGAG ACATCAGAGA AACTTTGGCT CCCTCCTGCC TCTGCACTT CACGTTGCTC TCCATGGCTG 3430
 CAGCATCCTT TTCTGAAGCC AGCAAGAGGT AGCCCGAGGG GTTGAACCGG AGGTCCAGGG GAGGAGCAGTC 3500
 GACTACGGCC AGGTACTCAT TGATGTTCCG TAGAAAGCTG GCTGAAAGA GGGAGAGCTG GATGTTCTCA 3570
 GGCAATGAGA ACTGCTGACA AATCCCCACCT ACTGAGAGCC CAGTGGAGGC CTGTGAATAC GTGTGGTCCC 3640
 GTTCCACCAC TAGCACTCGA ATAGCACCTC GTCTGCTCTC CAGCTTCTTC AGCCAATAGG CCACAGACAA 3710
 GCCAAGCACC CCACCTCCCA CGATCACCAAC ATCCGAGTGC TCGGGAGGCA GGTGGCTGGT GTCTTGCACT 3780
 AGATCACAGG ACCTTCCAGG CAGGATCGAC TTGATCTTCT TCTTAATCTC AGACACCTT CCATCCCAGT 3850
 CCAGAGAAAA GCCTCCTCTG CGCGTGCCTG GCCTCCGGGT CAAGAGGCC CGGCCCATGC CGTGCAGGCAG 3920
 AACCCCTCCGA ATCATAGCCC CTCTGAGGCC GGGTCGACGC GGCGCGCAAT TC 3972

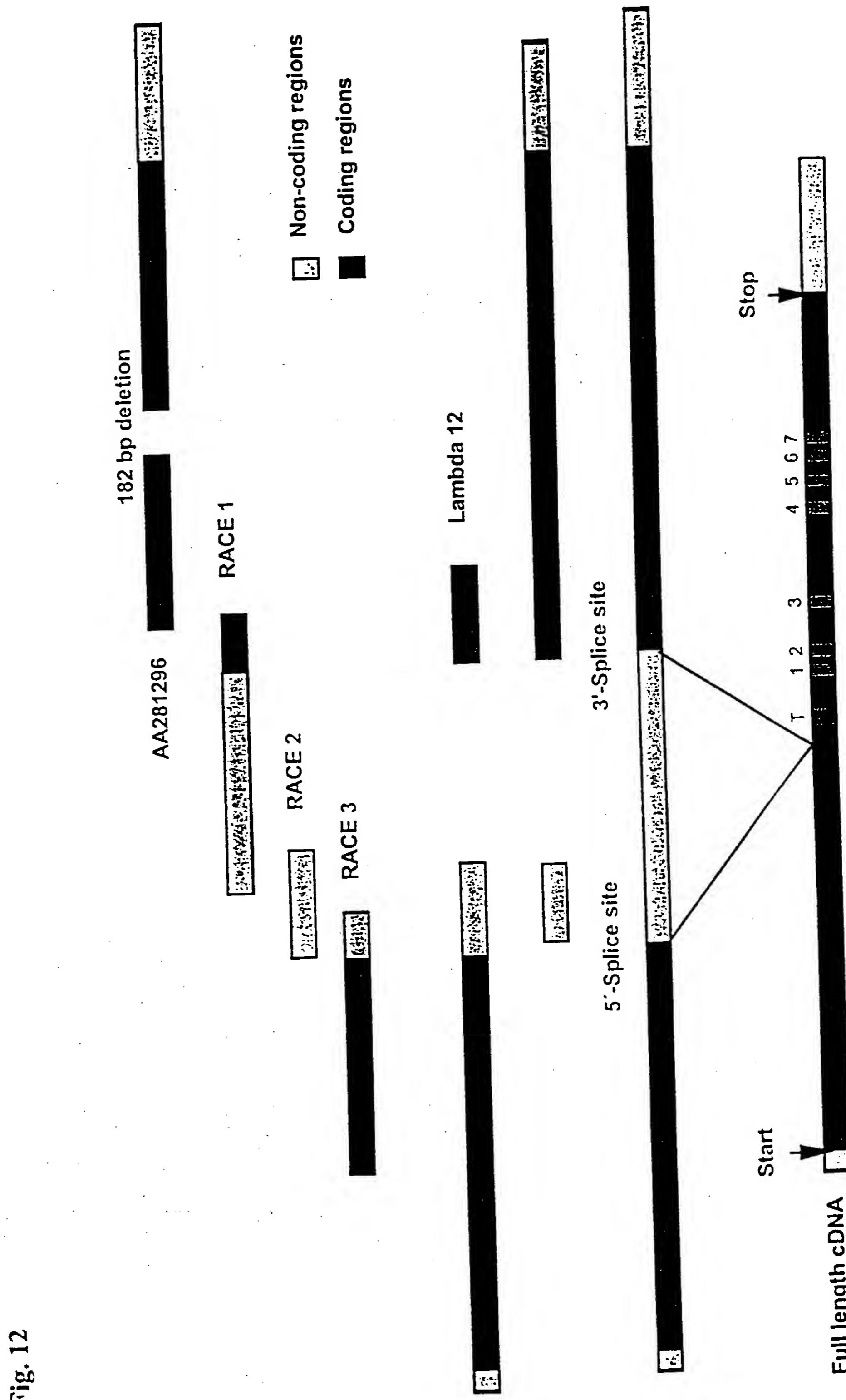


Fig. 12

Fig. 13

Telomerase motif

hTC	VVELLRSFFYVTE	RT1	p-hh-h-K	hR-h-----K	h-h-----K	hLG--h
Euplotes	VVSLI.RCFFYVTE		SRLRFLPK	LRPIVNMDYVVG	GCVVVNLRK	ALGGTA
	553		GKLRLIPK	FRPIMTFENKKIV	GFKFNMKK	KFAKYG
	565		619	626	895	902
		RT2		630	863	872
		RT3	PELYFVVKVDVTGAYDTI	704	913	918
			PELYFMKFDVKSCYDSI	720		
		RT4	h---hPQG---SF			
			QCQGIPQGSILST			
		RT5	h---yhDDhhhh			
			LLRLVDDFLI			
		RT6	LMRLLTDDYLL			
		RT7				

Fig. 14

CCGGAAGAGT	GTCTGGAGCA	AGTTGCAAAG	CATTGGAATC	AGACAGCACT	TGAAGAGGGT	GCAGCTGCGG	1853
GAGCTGTCGG	AAGCAGAGGT	CAGGCAGCAT	CGGGAAGCCA	GGCCCGCCCT	GCTGACGTCC	AGACTCCGCT	1923
TCATCCCCAA	GCCTGACGGG	CTGCGGCCGA	TTGTGAACAT	GGACTACGTC	GTGGGAGGCCA	GAACGTTCCG	1993
CAGAGAAAAG	AGGGCCGAGC	GTCTCACCTC	GAGGGTGAAG	GCACGTGTC	GCGTGCTCAA	CTACGAGCGG	2063
GCGCGGCGCC	CCGGCCTCCT	GGGCGCCCTC	GTGCTGGGCC	TGGACGATAT	CCACAGGGCC	TGGCGCACCT	2133
TCGTGCTGCG	TGTGCGGGCC	CAGGACCCGC	CGCCTGAGCT	GTACTTTGTC	AAGGTGGATG	TGACGGGCGC	2203
GTACGACACC	ATCCCCCAGG	ACAGGCTCAC	GGAGGTCACTC	GCCAGCATCA	TCAAACCCCA	GAACACGTAC	2273
TGCGTGCCTC	GGTATGCCGT	GGTCCAGAAG	GCCGCCATG	GGCACGTCCG	CAAGGCCTTC	AAGAGCCACG	2343
TCTCTACCTT	GACAGACCTC	CAGCCGTACA	TGCGACAGTT	CGTGGCTCAC	CTGCAGGAGA	CCAGCCCGCT	2413
GAGGGGTGCC	GTCGTATCG	AGCAGAGCTC	CTCCCTGAAT	GAGGCCAGCA	GTGGCCTCTT	CGACGTCTTC	2483
CTACGCTTCA	TGTGCCACCA	CGCCGTGCGC	ATCAGGGGCA	AGTCCTACGT	CCAGTGCAG	GGGATCCCGC	2553
AGGGCTCCAT	CCTCTCCACG	CTGCTCTGCA	GCCTGTGCTA	CGGCGACATG	GAGAACAAAGC	TGTTGCGGG	2623
GATTGGCGG	GACGGGCTGC	TCCTGCGTTT	GGTGGATGAT	TTCTTGTG	TGACACCTCA	CCTCACCCAC	2693
GCGAAAACCT	TCCTCAGGAC	CCTGGTCCGA	GGTGTCCCTG	AGTATGGCTG	CGTGGTGAAC	TTGCGGAAGA	2763
CAGTGGTGAA	CTTCCCTGTA	GAAGACGGAGG	CCCTGGGTGG	CACGGCTTTT	GTTCAGATGC	CGGCCCCACGG	2833
CCTATTCCCC	TGGTGCAGGCC	TGCTGCTGGA	TACCCGGACC	CTGGAGGTGC	AGAGCGACTA	CTCCAGCTAT	2903
GCCCGGACCT	CCATCAGAGC	CGATCTCAC	TTCAACCGCG	GCTTCAAGGC	TGGGAGGAAC	ATGCGTCGCA	2973
AACTCTTTGG	GGTCTTGCAG	CTGAAGTGTG	ACAGCCTGTT	TCTGGATTG	CAGGTGAACA	GCCTCCAGAC	3043
GTGTGCACC	AACATCTACA	AGATCCTCCT	GCTGCAGGCG	TACAGGTTTC	ACGCATGCGT	GCTGCAGCTC	3113
ATTCATC	AGCAAGTTG	GAAGAACCCC	ACATTTTCC	TGGCGTCAT	CTCTGACACG	GCCTCCCTCT	3183
TAATCCAT	CCTGAAAGCC	AAGAACCGAG	GTATGTGCAG	GTGCCTGGCC	TCAGTGGCAG	CAGTGCCTGC	3253
CTGCTGGTGT	TAGTGTGTCA	GGAGACTGAG	TGAATCTGGG	CTTAGGAAGT	TCTTACCCCT	TTTCGCATCA	3323
GGAAAGTGGTT	TAACCCAACC	ACTGTCAAGC	TCGTCTGCC	GCCCTCTCGT	GGGGTGAGCA	GAGCACCTGA	3393
TGGAAGGGAC	AGGAGCTGTC	TGGGAGCTGC	CATCCTTCCC	ACCTTGCTCT	GCCTGGGGAA	GCGCTGGGGGG	3463
GCCTGGTCTC	TCCTGTTTGC	CCCATGGTGG	GATTTGGGGG	GCCTGGCCTC	TCCTGTTGTC	CCTGTGGTGG	3533
GATTGGGCTG	TCTCCCGTCC	ATGGCACTTA	GGGCCCTTGT	GCAAACCCAG	GCCAAGGGCT	TAGGAGGAGG	3603
CCAGGCCCCAG	GCTACCCCAC	CCCTCTCAGG	AGCAGAGGCC	GCGTATCACC	ACGACAGAGC	CCCGCGCCGT	3673
CCTCTGCTTC	CCAGTCACCG	TCCTCTGCC	CTGGACACTT	TGTCCAGCAT	CAGGGAGGTT	TCTGATCCGT	3743
CTGAAATTCA	AGCCATGTG	AACCTGCGGT	CCTGAGCTTA	ACAGCTTCTA	CTTTCTGTTC	TTTCTGTGTT	3813
GTGGAGACCC	TGAGAAGGAC	CCTGGGAGCT	CTGGAAATT	GGAGTGAACCA	AAGGTGTGTC		3872

Fig. 15

Abb. A

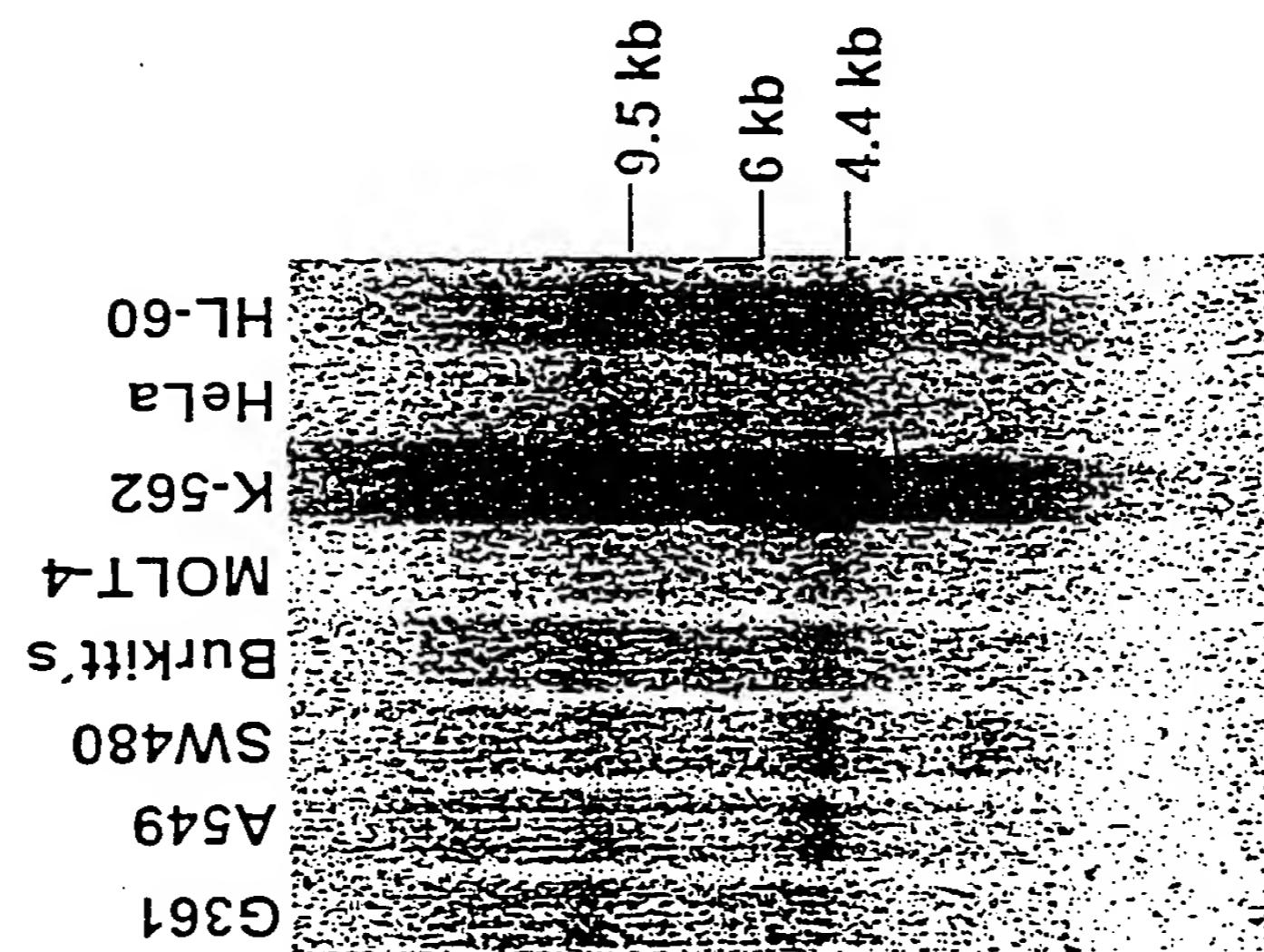


Abb. B

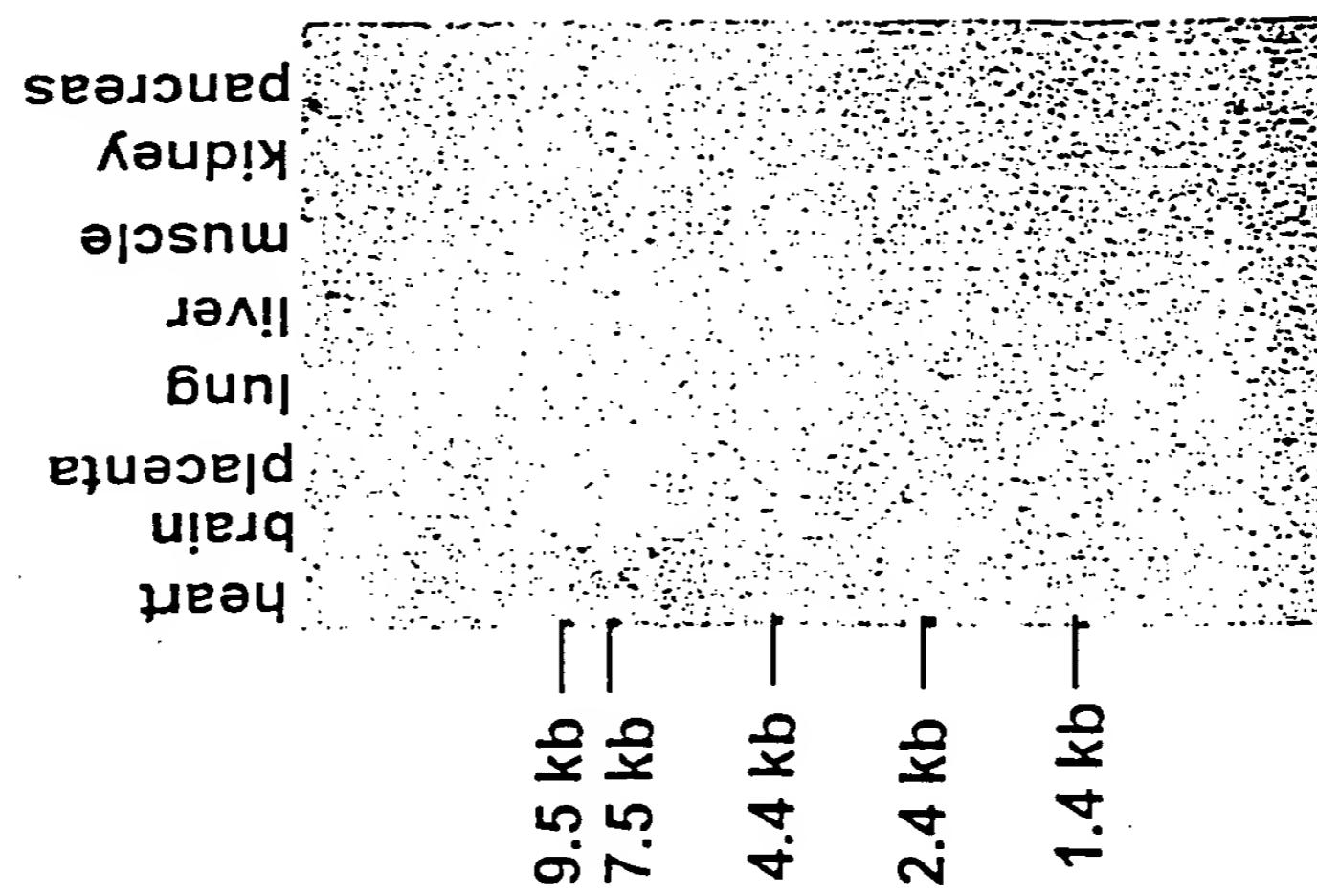


Fig. 16

Abb. A

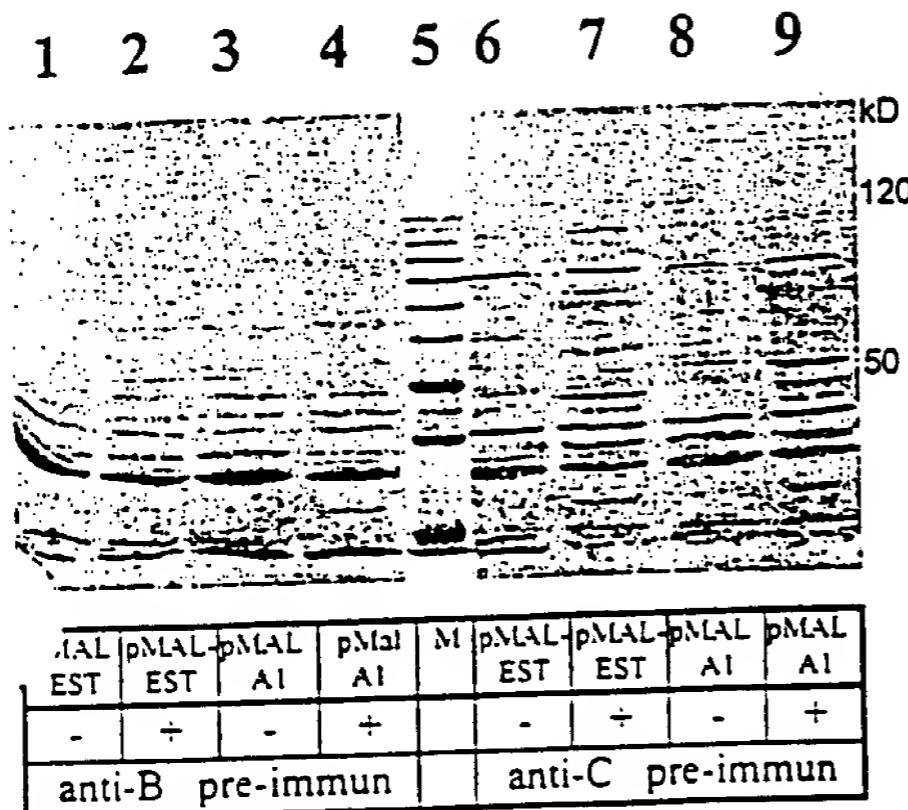


Abb. B

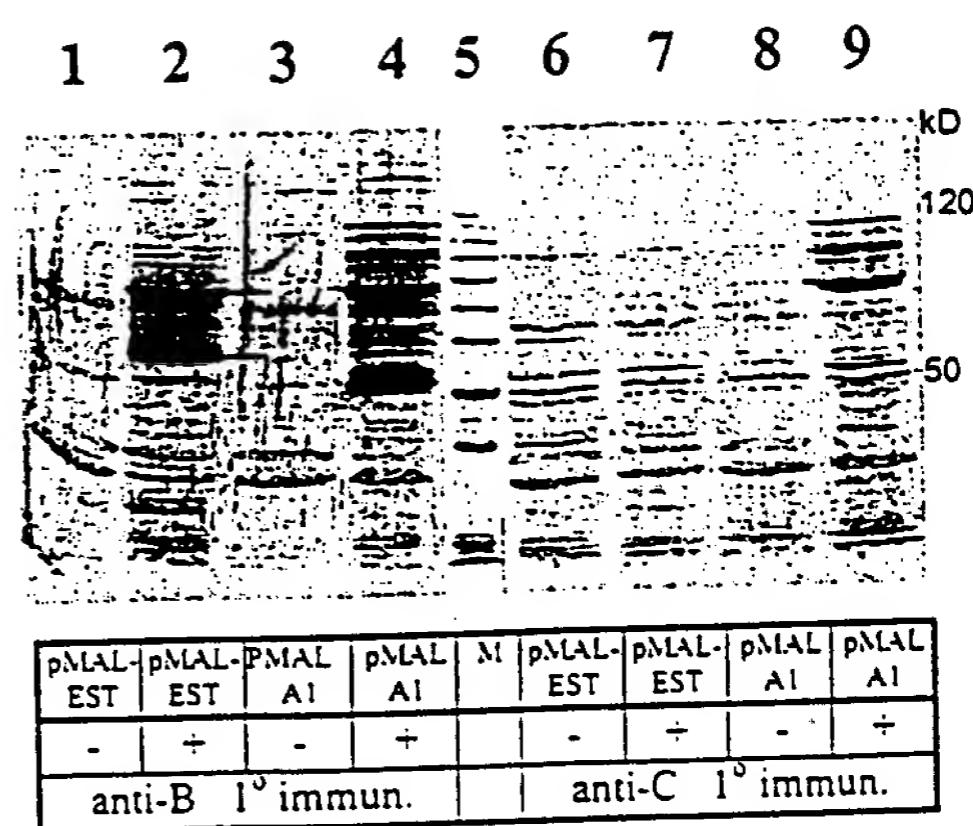
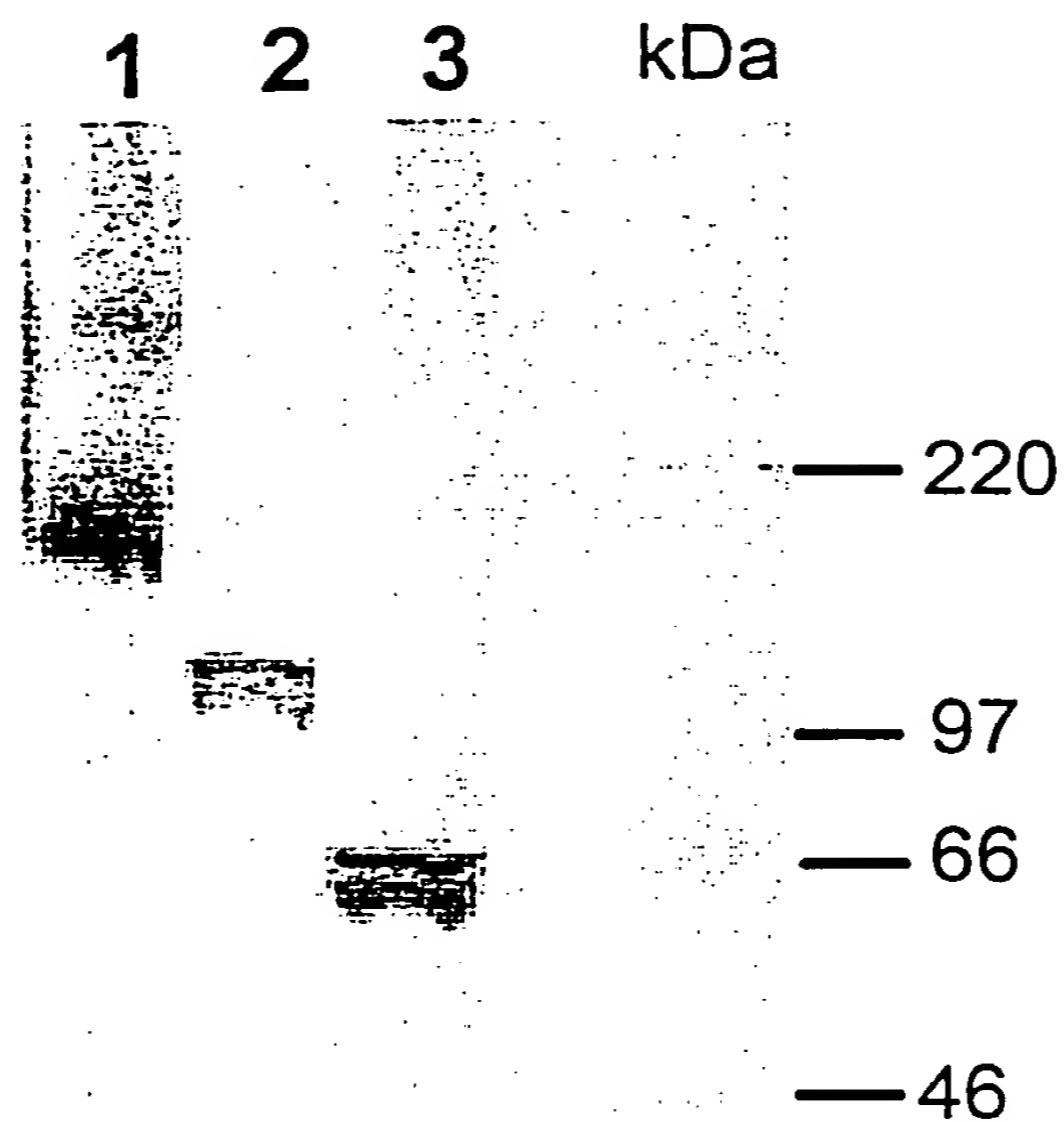


Fig. 17



Le A 32 486-DE-02

Fig. 18

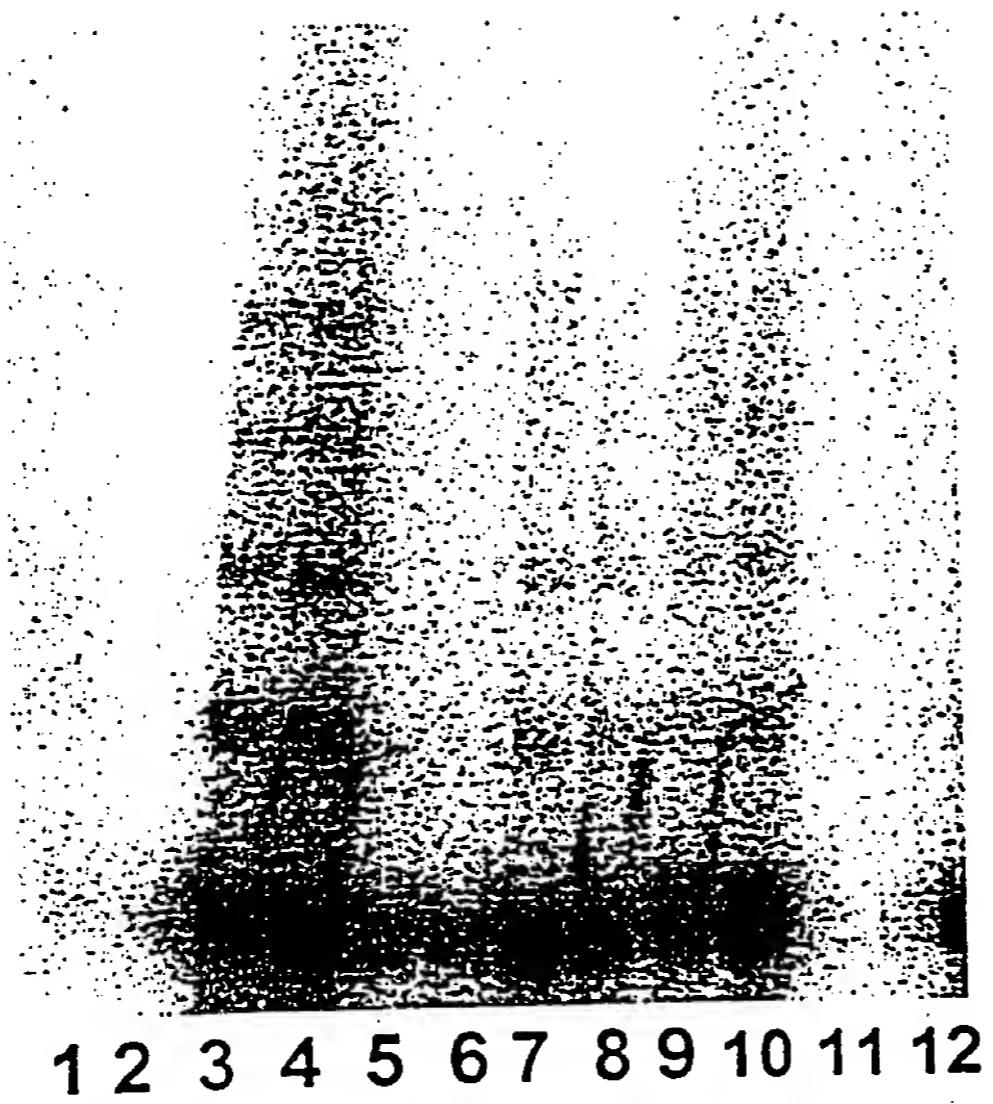


Fig. 19

1 2 3 4 5

